Zur Primärstruktur des ADP/ATP-Carriers aus Rinderherzmitochondrien

Das C-terminale acidolytische Fragment A2

WILFRIED BABEL

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0005

Zur Primärstruktur des ADP/ATP-Carriers aus Rinderherzmitochondrien

Das C-terminale acidolytische Fragment A2

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
WILFRIED BABEL
aus
Kempten

München
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Klingenberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der Abgabe der Arbeit: 10. 6.1981

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1981

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1976 bis Juli 1980 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludiwg-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. M. Klingenberg durchgeführt. Ihm und Herrn Dr. H. Aquila danke ich für die laufende Betreuung sowie für kritische Diskussionen und Anregungen.

Weiterhin habe ich zu danken:

- Herrn Dr. E. Wachter (Lehrstuhl Prof. Dr. Dr. Th. Bücher) für die Sequenzierung sämtlicher Peptide sowie für viele hilfreiche Anregungen;
- Herrn Dr. P. Fietzek und Herrn W. Straßhofer vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für fachliche Gespräche und für die Ausführung von Aminosäureanalysen;
- Herrn Dr. M. Eulitz vom Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, für die Ausführung der Aminosäureanalysen mit Methansulfonsäure.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Prof. Klingenberg danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dr. K. Beyer für die kritische Durchsicht der Arbeit, Frau H. Groß für die laufende, sorgfältige Präparation des Carrier-Proteins, Herrn H. Berger und seinen Mitarbeitern für die Lösung technischer Probleme bei den Experimenten sowie Frau R. Wirth für die Übernahme der Schreibarbeiten.

Inhaltsangabe

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	8
2.	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.2	Analytische Methoden	10
2.2.1	Proteinbestimmung	10
2.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	10
2.2.3	Dünnschichtchromatographie	10
2.2.4	N-terminale Endgruppenbestimmung	11
2.2.5	Aminosäureanalysen	11
2.2.6	Aminosäuresequenzbestimmung	12
2.3	Isolierung und Modifizierung des Carrier-Proteins	13
2.4	Spaltungen des Carrier-Proteins	14
2.4.1	Chemische Spaltungen	14
2.4.1.1	Bromcyanspaltung	14
2.4.1.2	Acidolytische Spaltung	15
2.4.1.3	Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure	15
2.4.2	Enzymatische Spaltungen	15
2.4.2.1	Tryptische Spaltung nach Citraconylierung	15
2.4.2.2	Inkubation mit Carboxypeptidase A und B	16
2.4.2.3	Inkubation mit Pyroglutamat-Aminopeptidase	17
2.4.2.4	Inkubation mit Elastase	17
2.4.2.5	Inkubation mit Pronase	17
2.5	Chromatographie der Spaltpeptide	18
2.6	Nomenklatur der Peptide	19

3.	Ergebnisse	20
3.1	Aminosäurezusammensetzung des Carrier-Proteins	20
3.2	Direkte N- und C-terminale Analyse des Carrier-Proteins	22
3.3	Isolierung und Charakterisierung der Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins	22
3.4	Limitierte saure Hydrolyse des Carrier-Proteins	45
3.5	Isolierung und Charakterisierung tryptischer Überlappungspeptide des acidolytischen Peptids A2	57
3.6	Vorversuche zur Charakterisierung des N-terminalen Bereichs des ADP/ATP-Carriers	67
3.7	Weitere Spaltungsversuche	70
4.	Diskussion	73
4.1	Löslichkeits- und Trennprobleme	73
4.2	Membranproteine mit bekannter Primärstruktur	75
4.3	Strukturelle Eigenschaften des C-terminalen Peptids A2	77
4.4	Einige Aspekte der Festphasen-Sequenziertechnik	79
4.5	Photoaffinitätsmarkierung des ADP/ATP-Carriers	79
4.6	Homologievergleiche mit anderen Membranproteinen	80
4.7	Ausblick	81

5.	Anhang	81
5.1	Die Chou-Fasman-Methode zur Vorhersage der Proteinsekundärstruktur	81
5.2	Regeln zum Auffinden helikaler Bereiche	86
5.3	Regeln zum Auffinden von Faltblatt-bereichen	87
5.4	Überlappende α- und ß-Bereiche	88
5.5	Regeln zum Auffinden von ß-turns	89
5.6	Vorhersage der Sekundärstruktur des acidolytischen Fragments A2 des ADP/ATP-Carriers	90
5.7	Überprüfung der Chou-Fasman-Regeln zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Membranproteinen am Beispiel des Bakteriorhodopsins	96
6.	Zusammenfassung	100
7.	Verzeichnis der Abkürzungen	102
8.	Literatur	103

1. Einleitung

1.1 Charakterisierung des Adeninnucleotid-Carriers

Die Umwandlung von Substrat-Oxidationsenergie in chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) läuft in den Mitochondrien ab, einer Organelle, die in den meisten eukaryontischen Zellen vorkommt. An der Energieumwandlung sind folgende Komponenten beteiligt: die aus Multiprotein-Komplexen bestehende Elektronentransportkette, die ATP-Synthetase, die Adeninnucleotid-Translokase und das Phosphat übertragende System.

Die Hülle des Mitochondrions ist aus zwei Membranen aufgebaut, der inneren und der äußeren. Die äußere Membran, die für den Mechanismus der Energieumwandlung bedeutungslos ist, ist für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von einigen Tausend Dalton permeabel (1). Die innere Mitochondrienmembran, deren Oberfläche durch Einbuchtungen (Cristae) stark vergrößert ist, stellt die eigentliche Barriere dar, da sie für die meisten Substanzen impermeabel ist. Sie enthält neben den Transport-Proteinen für Adeninnucleotide und Phosphat eine Reihe weiterer Transportsysteme (2) für Metabolite, die als Intermediate im Stoffwechsel dienen.

Diese "integralen Membranproteine" (3), die fest in der Phospholipid-Doppelschicht verankert sind, können nur durch Zerstörung der Membran mit Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln solubilisiert werden. Im Unterschied dazu lassen sich "periphere Membranproteine" (3) (ein typischer Vertreter dieser Spezies ist Cytochrom c) bereits durch Erhöhung der Ionenstärke oder durch pH-Veränderungen von der Membran ablösen, ohne daß die Lipidstruktur der Membran beeinträchtigt wird(4). Zur Gruppe der in der inneren Mitochondrienmembran vorkommenden "integralen Membranproteine" gehören die Acyl-CoA-Dehydrogenase, die α-Glycerophosphat-Dehydrogenase, die β-Hydroxybutyrat-Dehyrogenase und die Pyridinnucleotid-Transhydrogenase (2). Zusätzlich enthält diese Membran eine Reihe von Transportsystemen für ein- und zweiwertige Kationen(5). Diese Beispiele machen das hohe Protein/Phospholipid-Verhältnis der inneren Mitochondrienmembran verständlich. Der Proteinanteil beträgt etwa 70%.

Der am besten untersuchte Transportvorgang an der inneren Mitochondrienmembran ist der Austausch von ADP, das aus dem Cytosol stammt, gegen ATP aus dem Matrixraum (6 - 13). Dieses hochspezifische Anionentransport-System (AMP wird z.B. nicht transportiert(14)) ist, neben dem Phosphat-Transport-System, das aktivste in aeroben eukaryontischen Zellen.Es stellt in den Mitochondrien das Bindeglied dar zwischen den energieverbrauchenden Prozessen im Cytosol und den energieliefernden Prozessen der oxidativen Phosphorylierung. Die Kinetiken des

im strengen 1:1-Verhältnis ablaufenden Gegentausches von ADP gegen ATP wurden mit Hilfe dreier hochspezifischer Inhibitoren, die den Adeninnucleotid-Transport blockieren, untersucht: Atractylat, Carboxyatractylat und Bongkrekat. Die ersten beiden Inhibitoren sind Glycoside pflanzlichen Ursprungs, deren Aglycon ein Diterpen ist (15 - 16). Bongkrekat ist eine langkettige, mehrfach ungesättigte Tricarbonsäure bakteriellen Ursprungs (17). Alle drei Inhibitoren sind radioaktiv markierbar und erleichtern so Bindungs- und Inhibierungsstudien (18 - 23).

Während Atractylat und Carboxyatractylat als membranimpermeable Substanzen die Carrierbindungsstellen auf der cytosolischen Seite der inneren Membran fixieren ("c-Zustand"), immobilisiert Bongkrekat als membranpereamble Verbindung die Adeninnucleotid-Bindungsstellen auf der Matrixseite der Mitochondrienmembran ("m-Zustand"). Der Übergang von der "c-Konformation" in die "m-Konformation" ist nur möglich, wenn die natürlichen Substrate ADP oder ATP anwesend sind, nicht dagegen im ligandenfreien Zustand oder in Gegenwart der Transportinhibitoren.

Diese Befunde führten zur Postulierung eines konformationsbedingten "Gated-pore-Mechnismus" für den Adeninnucleotid-Transport (24).

Der Adeninnucleotid-Transport ist im Prinzip ein energieunabhängiger Prozeß, d.h. ADP und ATP werden mit gleicher Geschwindigkeit sowohl vom cytoplasmatischen Kompartiment in die Mitochondrien als auch in die entgegengesetzte Richtung transportiert (25). Dieser Zustand ist in entkoppelten Mitochondrien verwirklicht (z.B. wird durch die Zugabe von 2,4-Dinitrophenol die Verknüpfung von Substratoxidation und ATP-Synthese unterbrochen; die Mitochondrien produzieren nur noch Wärme). Dagegen ist in normalen, gekoppelten Mitochondrien der ADP/ATP-Gegentausch asymmetrisch: Im Aufnahmeschritt wird ADP gegenüber ATP bevorzugt ($V_{ATP}/V_{ADP} = 0.2$). Im umgekehrten Prozeß der Freisetzung der Adeninnucleotide wird ATP begünstigt ($V_{ATP}/V_{ADP} = 5$). Von den vier möglichen Gegentauschvarianten (ATP-ATP, ADP-ADP, ADP-ATP, ATP-ADP), die im entkoppelten Zustand etwa gleich aktiv sind, wird im gekoppelten Zustand die ADP-Aufnahme verbunden mit der Abgabe von ATP 20-fach bevorzugt.

Dieser asymmetrische Gegentausch führt zu einem höheren Phosphorylierungspotential ($[ATP] / [ADP] \cdot [P]$) außerhalb der Mitochondrien (66 kJ) verglichen zum innermitochondrialen Matrixraum (55 kJ) (26). Reguliert wird dieser Prozeß durch ein Membranpotential, das durch den Transport einer negativen Ladung verursacht wird (Gegentausch von ATP^{4-} gegen ADP^{3-}). Die Energie für diesen Ladungsausgleich, der von einem Protonentransport begleitet ist, stammt aus der Hydrolyse von ATP.

Die Isolierung des durch Atractylat oder Carboxyatractylat in der "c-Konformation" oder durch Bongkrekat in der "m-Konformation" fixierten Carrier-Proteins im nativen Zustand als Inhibitor-Protein-Komplex gelang durch die Solubilisierung der Membran mit dem nichtionischen Detergens Triton X-100 und anschließender Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit, gefolgt von einem Gelchromatographieschritt (27 - 29). Die Stabilität der einzelnen Proteinpräparationen in Hinsicht auf proteolytischen Abbau und Freisetzung der Inhibitoren nimmt in folgender Reihe ab: Carboxyatractylat-Protein-Komplex > Atractylat-Protein-Komplex > Bongkrekat-Protein-Komplex > ligandenfreies Carrier-Protein. Für die Untersuchungen zur Primärstruktur wurde aus diesen Gründen ausschließlich der aus Rinderherzmitochondrien isolierte Carboxyatractylat-Protein-Komplex verwendet.

Das aus Rinderherzmitochondrien isolierte Carrier-Protein zeigt bei der Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese (30) eine einheitliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 29.000. Dieses Polypeptid ist das in Mitochondrien am häufigsten vorkommende; es macht etwa 9% des Gesamtproteingehalts aus. Ultrazentrifugationsuntersuchungen des gereinigten Proteins, bei dem durch vorhergehende Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation der Überschuß an Detergens und Phospholipiden entfernt worden war, ergaben, daß das Protein in Triton X-100 als Dimer vorlag (31). Analog durchgeführte Untersuchungen mit weiteren Detergenzien (Emulphogen BC720, Lauramido-dimethylpropyl-aminoxyd) führten zum selben Ergebnis (32). Die

hohe Tritonbindung des Proteins (1,47 g/g Protein, das entspricht etwa 150 Mol Detergens pro Mol dimeres Protein) und der Anteil an gebundenen Phospholipiden, der auch bei einem zweiten Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugationsschritt nicht weiter reduzierbar war (0,25 g/g Protein, das entspricht ca. 16 Mol Phospholipid pro Mol dimeres Protein) lassen eine tiefe Verankerung des Carrier-Proteins in der Phospholipid-Doppelschicht der Membran erwarten. Im Gegensatz dazu ist der durch Circulardichroismus-Messungen ermittelte helikale Anteil des Proteins mit 40% (26) etwa vergleichbar mit Werten anderer nucleotidbindender Proteine. Dieser Befund steht dem Postulat entgegen, daß sich Membranproteine durch einen hohen helikalen Anteil auszeichnen.

Inkorporiert man inhibitorfreies Carrier-Protein in künstliche Liposomen, erreicht man eine Stabilisierung des in diesem Zustand an sich labilen Proteins. In diesem System lassen sich die Bindungsaffinitäten der natürlichen Liganden ADP und ATP und der verschiedenen Transport-Inhibitoren messen (33 - 35). Das rekonstituierte System zeigt dieselben Inhibierungseffekte wie Mitochondrien; der 1:1-Gegentausch von ADP/ATP ist ebenso membranpotentialabhängig wie im vivo System.

Einige Untereinheiten der ATPase, der Cytochrom-Oxidase und Cytochrom b aus Neurospora crassa Mitochondrien werden intramitochondrial synthetisiert (36 - 38). Es wird angenommen,

daß diese Proteine aufgrund ihres hydrophoben Charakters nicht vom Cytoplasma in die mitochondriale Membran transportiert werden können und deswegen im Matrixraum nahe der inneren Mitochondrienmembran synthetisiert werden. Dagegen wurde an Neurospora crassa gezeigt, daß der ADP/ATP-Carrier trotz seines relativ niedrigen Polaritätsindexes von 0,41 an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird (39). Außerdem wurden im Cytoplasma von Neurospora crassa und Hefe ein Pool an Carboxyatractylat-bindendem Protein (CAT-Protein) identifiziert (40 - 41), mit demselben Molekulargewicht wie das ADP/ATP-Carrier-Protein, das aus den entsprechenden Mitochondrien isoliert worden war (42 - 44).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ein Weg, um Aussagen über die Wirkungsweise des ADP/ATP-Carriers auf molekularer Ebene machen zu können, ist die Ermittlung der Primärstruktur dieses Proteins. Eine andere Möglichkeit, einen Einblick in den Mechanismus der Protein-Ligand-Wechselwirkung mit röntgenographischen Methoden zu erhalten, steht noch aus, da es bisher noch nicht möglich ist, den Detergens-Ligand-Protein-Komplex in zwei- oder dreidimensionalen Kristallen zu erhalten.

In dieser Arbeit ist die Isolierung und Charakterisierung der C-terminalen Partialsequenz des ADP/ATP-Carriers aus Rinderherz-Mitochondrien beschrieben. Als chemische Fragmentierungsmethoden wurden die Spaltung mit Bromcyan und die limitierte saure Hydrolyse in Ameisensäure verwendet. Die Aneinanderreihung der Peptide erfolgte mit Hilfe tryptischer Überlappungspeptide. Da sowohl das Ausgangspeptid als auch die gewonnenen Fragmente in wässrigen Puffersystemen schwer löslich waren, mußten geeignete Trennverfahren angewandt werden. Der hier beschriebene C-terminale Bereich des Carrier-Proteins umfaßt mit 94 Aminosäureresten etwa ein Drittel des gesamten Proteins.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Triton X-100, o-Iodosobenzoesäure und Cytochrom c stammten von der Fa. Sigma, Bromcyan, 1,4-Dithioerythrit und Fluorescamin von der Fa. Fluka. Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Coomassie Brilliant Blue G250, Dansylchlorid, Dansylaminosäuren und das Dipeptid Pyroglutamat-Ala und Pronase wurden von der Fa. Serva bezogen. Elastase, Pyroglutamat-Aminopeptidase, Carboxypeptidase A und B und Carboxyatractylat waren von der Fa. Boehringer Mannheim. L-(1-Tosylamido-2-phenyl)ethylchlormethylketon (TPCK) behandeltes Trypsin, Citraconsäureanhydrid, Kieselgel- und Cellulosedünnschichtplatten stammten von der Fa. Merck, doppelbeschichtete Polyamidfolien von der Fa. Schleicher & Schüll, Trasylol von der Fa. Bayer, Thermolysin von der Fa. Calbiochem und Staphylococcus aureus V-8 Protease von der Fa. Miles. Sepharose 6B, Sephadex G-25, G-200 und LH 60 wurden von der Fa. Pharmacia, Bio-Gel P-2, P-6, P-10, P-30, AG 50-WX8, AG 1-X2 von der Fa. Bio Rad und AcA 34 von LKB bezogen. Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden mit Ausnahme der Salzsäure, die für Peptidhydrolysen destilliert wurde, ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt. Hydroxylapatit wurde nach Tiselius, wie von Bernardi (45) beschrieben, selbst hergestellt.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry et al. (46) in Gegenwart von 0,1% SDS, um die Triton-Präzipitation zu vermeiden (47), oder nach Bode et al. (48) durchgeführt, mit Rinderserumalbumin als Standard.

2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Polypeptiden mit einem Molekulargewicht größer als 20 000 erfolgte nach Neville (30). Verwendet wurden 5x100 mm Gele mit 11% Acrylamid und 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Kleinere Peptide, mit einem Molekulargewicht von etwa 1800 bis 12 000 wurden routinemäßig mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wie von Swank und Munkres (49) beschrieben, untersucht (12,5% Acrylamid, 1,25% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1% SDS, 100 mM TRIS-phosphat pH 6,8, 8 M Harnstoff). Als Eichpeptide dienten Cytochrom c (M_r = 12 300), Trasylol (M_r = 6700) und die Bromcyanbruchstücke von Cytochrom c (M_r = 7800, 2800, 1800). Die einzelnen Banden wurden densitometrisch mit einem umgebauten Eppendorf-Photometer bei 578 nm aufgezeichnet.

2.2.3 Dünnschichtchromatographie

Die analytische Dünnschichtchromatographie der Spaltpeptide

erfolgte auf Kieselgelplatten (ohne Fluoreszenzindikator) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm und auf Celluloseplatten mit einer Schichtdiche von 0,1 mm. Als Laufmittel wurden verwendet: Chloroform:Methanol: 25% Ammoniak = 2:2:1 (LMI) und Pyridin:Essigsäure:n-Butanol:Wasser = 40:14:68:25 (LMII) (50). Sichtbar gemacht wurden die Peptide durch Bestreichen der 30 Minuten bei 100°C getrockneten Platten mit einer 0,0033%igen Lösung von Fluorescamin in Aceton (51, 52) und anschließendem Betrachten bei 350 nm, oder mit dem Chlor/o-Tolidin-Reagens nach Reindel und Hoppe (53).

2.2.4 N-terminale Endgruppenbestimmung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren der Spaltpeptide erfolgte nach der Dansyl-Methode (54) in 100 mM Triäthylaminpuffer. Die Identifizierung der dansylierten Aminosäuren wurde nach 6-stündiger Hydrolyse des modifizierten Peptids bei 110°C in 5,7 N Salzsäure und Dünnschichtchromatographie der über KOH getrockneten Proben auf doppelt beschichteten Polyamid-Folien in folgenden Fließmitteln durchgeführt:

a) 1,5% Ameisensäure, dann senkrecht dazu:
b) Benzol:Eisessig = 9:1 (v:v) und in derselben Dimension wie b):
c) Essigsäureethylester:Essigsäure:Methanol = 20:1:1 (v:v).

2.2.5 Aminosäureanalysen

Das Carrier-Protein, das N-terminale Bromcyanfragment B 1 und die beiden acidolytischen Bruchstücke A1 und A2 wurden

sowohl mit 5,7 N Salzsäure als auch mit 4 M Methansulfonsäure/ 0,2% 3-(2-Aminoethyl)Indol (55) 24, 48 und 72 Stunden bei 110° hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit einem Durrum D-500 bzw. einem Biotronik Aminosäureanalysator untersucht. Die Hydrolyse mit Methansulfonsäure diente der Erfassung des Tryptophan- und des Methioningehaltes der großen Spaltpeptide, da diese beiden Aminosäuren bei der salzsauren Hydrolyse ganz oder teilweise zerstört werden. Die kleineren Spaltpeptide wurden routinemäßig 20 Stunden bei 110° mit 5,7 N Salzsäure hydrolysiert (50 µl für etwa 1-2 nmol Peptid) und mit einem Durrum D-500 analysiert. Um den Homoseringehalt der Bromcyanpeptide nach der salzsauren Hydrolyse quantitativ erfassen zu können, wurden die eingetrockneten Hydrolysate 30 Minuten bei 60°C mit 50 µl 2% Piperidinlösung (v/v) inkubiert. Dabei werden die durch saure Katalyse cyclisierten Homoserinlactone wieder zum ursprünglichen Homoserin geöffnet.

2.2.6 Aminosäuresequenzbestimmung

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz der einzelnen Spaltpeptide wurde von Dr. E. Wachter nach der Festphasenmethode durchgeführt. Die verschiedenen Verfahren zur Immobilisierung der Peptide an derivatisiertem Glas, das Abbauprogramm und die Weiterverarbeitung der entstandenen Phenylthiohydantoine sind in (56) beschrieben.

2.3 Isolierung des Carrier-Proteins

Mitochondrien aus Rinderherzen frisch geschlachteter Tiere wurden nach Löw & Vallin (57) präpariert und unmittelbar danach mit 4 nMol CAT/mg Protein in 0,25 M Sucrose, 10 mM MOPS, pH 6,8 15 Minuten bei 0°C beladen. Die beladenen Mitochondrien wurden nach dem Zentrifugieren portionsweise (2g) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Solubilisierung des CAT-Protein-Komplexes mit Triton X-100 erfolgte in Anlehnung an Riccio et al. (27 28). CAT-beladene Rinderherzmitochondrien wurden in einer Konzentration von 30 mg/ml in 400 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 4% Triton X-100, 10 mM MOPS, pH 7,2, solubilisiert. Nach 30 Minuten bei $0^{\circ}C$ wurde das Homogenat 30 Minuten bei 140 000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde dann an einer Hydroxylapatit-Säule (45) chromatographiert; das Packungsvolumen betrug 2 ml pro 1 mg Protein. Als Äquilibrierungs- und Trennpuffer diente 200 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 10 mM MOPS, pH 7,2. Der vereinigte Durchlauf der Spitzenfraktionen von ursprünglich 2 g Rinderherzmitochondrien wurde anschließend, nachdem er durch Druckdialyse konzentriert worden war, auf eine AcA 34-Säule aufgetragen. Als Elutionspuffer diente: 200 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 0,05% Na-Azid, 0,05 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2.

Die Spitzenfraktionen der AcA 34-Säule, die etwa 70-90 mg Carrier-Protein enthielten, wurden nach der Präzipitation

mit Aceton/Trichloressigsäure (58) in 0,1% SDS, 100 mM TRIS, ph 8,0 rechromatographiert. Bei diesem Präzipitationsschritt wurde auch der Hauptanteil des ungebundenen Triton X-100 entfernt. Um mögliche Cystin-Brücken zu spalten und Cysteinreste vor Oxidation oder Rekombination zu schützen, wurde das Carrier-Protein nach der von Crestfield (59) beschriebenen Methode in Gegenwart von 8M Harnstoff, 1% SDS mit 1,4 - Dithioerythrit oder Mercaptoethanol reduziert und anschließend mit Jodessigsäure carboxymethyliert. Nach dem Entsalzen auf einer Sephadex G-25-Säule in 100 mM TRIS-HCl, 0,1% SDS, pH 8,0, wurden die Spitzenfraktionen vereinigt und als Ausgangsmaterial für die Spaltansätze bei 4°C gelagert.

2.4 Spaltungen des Carrier-Proteins

2.4.1 Chemische Spaltungen

2.4.1.1 Bromcyanspaltung

Dieses Verfahren zur Spaltung am Carboxylende von Methioninresten wurde nach Gross (60) durchgeführt. Carrier-Protein wurde in 98% Ameisensäure gelöst und mit Wasser auf eine Säurekonzentration von 80% verdünnt (Proteinendkonzentration: 10 mg/ml). Das Reagens wurde in einem 1000-fachen molaren Überschuß (bezogen auf Methionin) eingesetzt. Der Spaltansatz wurde unter Stickstoff im Dunkeln bei Raumtemperatur über Nacht aufbewahrt. Nach der Zugabe eines 5-fachen Über-

schusses an Wasser wurde der Überschuß an Reagens mit einem Rotationsverdampfer entfernt.

2.4.1.2 Acidolytische Spaltung

Die limitierte saure Hydrolyse des Carrier-Proteins wurde entweder durch Lösen des Proteins in 80% Ameisensäure oder durch Suspendierung in 1 N Salzsäure ausgeführt (Proteinkonzentration jeweils 10 mg/ml) (61). Aliquots wurden dann bei 37°C, 56°C und 80°C bis zu 3,5 Stunden erwärmt. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Proben entnommen, das Lösungsmittel im Exsikkator über festem Kaliumhydroxid entfernt und gelelektrophoretisch untersucht (sowohl mit dem Neville- als auch mit dem Swank/Munkres-System).

2.4.1.3 Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure

Zur Spaltung von Peptiden an Tyrosin- und Tryptophanresten wurde o-Iodosobenzoesäure verwendet (62, 63). Peptide wurden in 80% Ameisensäure gelöst (Konzentration 10 mg/ml) und mit einem 10-fachen molaren Überschuß des Reagens (bezogen auf Tyrosin und Tryptophan) versetzt. Die Spaltung erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln.

2.4.2 Enzymatische Spaltungen

2.4.2.1 Tryptische Spaltung nach Citraconylierung

Der auf Argininreste beschränkte tryptische Abbau von Pepti-

den durch die Blockierung der Lysine mit Citraconsäureanhydrid ist in (64) beschrieben. Das Verfahren wurde etwas modifiziert, da das C-terminale acidolytische Fragment selbst in 6 M Guanidin-Hydrochlorid nur wenig löslich war: 5 mg Peptid wurden in einem Gemisch aus 1 ml 6 M Guanidin-Hydrochlorid und 0,75 ml Pyridin gelöst und der pH-Wert auf 8,5 mit 2 N Natronlauge eingestellt. Nach der Zugabe von Citraconsäureanhydrid, in 100-fach molarem Überschuß (bezogen auf Lysin) bei 0°C wurde die Lösung mehrere Male gegen Wasser und zum Schluß gegen 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,0 dialysiert. Das modifizierte Peptid wurde 30 Minuten bei 37°C mit 2 Mol-% L-(1-Tosylamido-2-Phenyl)ethylchlormethylketon behandeltem Trypsin in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, pH 8,0, gespalten (Peptidkonzentration 10 mg/ml). Die Spaltung wurde durch Zugabe von 98% Ameisensäure und anschließender Gefriertrocknung unterbrochen.

2.4.2.2 Inkubation mit Carboxypeptidase A und B

Zur Bestimmung C-terminaler Aminosäuren wurden sowohl Peptide als auch das Carrier-Protein in 0,2 M N-Ethylmorpholinpuffer gelöst oder suspendiert (Proteinkonzentration 5 mg/ml) und mit 2 Mol% Carboxypeptidase A oder einer Mischung aus Carboxypeptidase A und B inkubiert (65). Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Zu festgesetzten Zeitpunkten (zwischen 5 Minuten und 20 Stunden) wurden Proben entnommen, mit 98% Ameisensäure angesäuert und zentrifugiert. Die Überstände, die die freigesetzten C-terminalen Aminosäuren enthielten,

wurden, nachdem sie gefriergetrocknet worden waren, mit Hilfe eines Aminosäureanalysators untersucht.

2.4.2.3 Inkubation mit Pyroglutamat-Aminopeptidase

Zur Abspaltung des Pyroglutamatrestes N-terminal blockierter Peptide wurde 1 mg Peptid in 1 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 gelöst, der 5 mM 1,4-Dithioerythrit, 10 mM EDTA und 5% Glycerin (v/v) enthielt (66), mit 2 x 0,5 mg Enzympräparation inkubiert. Der Abbau wurde nach 24 Stunden durch Zugabe von Essigsäure beendigt. Zur Kontrolle wurde das Modell-Dipeptid Pyr-Ala unter denselben Bedingungen inkubiert. Der Erfolg der Inkubation N-terminal blockierter Peptide mit Pyroglutamat-Aminopeptidase wurde durch die Umsetzung der nun frei zugänglich gewordenen N-terminalen Aminosäuren mit Dansyl-Chlorid überprüft.

2.4.2.4 Inkubation mit Elastase

Carrier-Protein wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, pH 8,0, mit 2 Mol-% Elastase bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 18 Stunden.

2.4.2.5 Inkubation mit Pronase

10 mg Carrier-Protein wurden in 1 ml 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,0, der 2 mM Calciumchlorid enthielt, sus-

pendiert und 16 Stunden bei 37°C mit 2 Mol-% Pronase inkubiert. Der Abbau wurde durch Zugabe von Essigsäure gestoppt.

2.5 Chromatographie der Spaltpeptide

Die Auftrennung der Spaltpeptide durch Fraktierung nach ihrer Größe erfolgte hauptsächlich durch Gelchromatographie mit Bio-Gel P-30 minus 400 mesh in 80% Ameisensäure (67, 68) und mit dem modifizierten Dextrangel Sephadex LH 60 in einem Gemisch bestehend aus 30% Ameisensäure/70% Ethanol (v/v) (69). Die Säulen waren 1,40 m lang, hatten einen Querschnitt von 0,6-0,7 cm und wurden volumenkonstant mit einer Kolbenspritzpumpe eluiert (0,96 ml pro 1 h). Sämtliche Chromatographieschritte zur Fraktionierung der Spaltpeptide wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um unerwünschte hydrolytische Nachspaltungen der bereits fraktionierten Peptide zu vermeiden, wurden die peptidhaltigen Fraktionen bei ca. 5°C im Kühlraum aufbewahrt. Die Absorption der Säuleneluate bei 280 nm wurde mit einem Durchfluß-Spektralphotometer der Fa. Hitachi (Typ 100-10) gemessen, das mit einer Deuteriumlampe ausgerüstet war (80 µl Durchflußküvette, Lichtweg 10 mm). Die Absorptionswerte wurden kontinuierlich mit einem 6-Kanal-Fallbügelschreiber (Fa. Colora) aufgezeichnet. Daneben wurde ein Durchflußphotometer der Fa. Isco (Typ UA 5) verwendet, das mit einer Quecksilberdampflampe und fest eingestellten Filtern ausgestattet war (10 µl Durchflußküvette, Lichtweg 5 mm). Zwischen dem Photometer und dem Fraktionssammler wurde noch ein Differentialrefraktometer (Modell SR 210, Fa. Siemens) instal-

liert, das auch Peptide erfaßt, die keine aromatischen Aminosäurereste enthielten.

2.6 Nomenklatur der Peptide

Als Abkürzungen für die bei den jeweiligen Spaltmethoden entstandenen Fragmente wurden verwendet:
A für acidolytische, B für Bromcyan, T_C für tryptisch citraconylierte, T für tryptische und o-JBA für Peptide, die durch Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure entstanden waren. Bei Nachspaltungen von Peptidfragmenten wurde das Symbol der Erstspaltmethode vorangesetzt. B6T1 beispielsweise bedeutet den Fraktionsbereich 1 der tryptischen Nachspaltung des Bromcyanpeptids B6.

Die Fragmente der Erstspaltungen sind entsprechend ihrer Plazierung innerhalb der Primärstruktur des Carrier-Proteins numeriert. In dieser Reihenfolge werden sie in den nächsten Kapiteln auch besprochen.

Bei den Aminosäureresten beginnt die Numerierung beim acidolytischen Fragment A2, da die Numerierung vom blockierten N-Terminus des gesamten Proteins aus noch nicht möglich ist. Die Bezeichnungen der Aminosäurereste sind deswegen mit einem Apostroph gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Aminosäurezusammensetzung des Carrier-Proteins

Um einen genauen Überblick über die Aminosäurezusammensetzung des Carrier-Proteins zu erhalten, wurden Aminosäurehydrolysen mit 5,7 N Salzsäure oder 4 M Methansulfonsäure in Gegenwart von 0,2% 3-(2-Aminoethyl)indol (55) durchgeführt. Die Zusammenfassung der Werte einer Salzsäure- und einer Methansulfonsäure-Hydrolysekinetik über 1-3 Tage ist in Tabelle 1 dargestellt, basierend auf 28 Alaninresten.

	A				B			
	24h	48h	72h	extra-pol.	24h	48h	72h	extra-pol.
CM-Cys	-				1.5	1.2	1.1	2
Asp	19.4	19.2	19.2	19	18.8	19.0	18.5	19
Thr	10.7	9.9	9.3	11	10.3	10.0	9.7	11
Ser	10.7	8.6	7.2	13	11.5	10.6	9.5	13
Glu	17.2	16.5	17.4	17	17.7	18.2	18.1	18
Pro	7.2	7.1	6.7	7	6.7	4.8	7.0	7
Gly	25.8	25.4	26.0	26	25.1	25.5	25.5	26
Ala	=28	=28	=28	28	=28	=28	=28	28
Val	18.4	18.7	19.0	19	18.1	19.8	20.0	20
Met	2.4	-	1.3	3	5.7	3.7	4.3	6-7
Ile	14.1	14.4	15.1	15	11.7	13.6	14.5	15
Leu	20.6	20.8	20.4	21	19.4	19.9	20.0	20
Tyr	5.7	4.4	6.4	6	10.3	10.5	10.7	11
Phe	17.1	16.8	17.1	17	17.3	17.8	18.0	18
Trp	-	-	-	-	6.4	5.8	6.9	7
His	2.7	2.7	2.8	3	-	-	-	-
Lys	15.7	15.9	16.9	17	18.5	19.0	19.2	19
Arg	13.6	13.2	13.1	14	14.6	14.6	15.1	15

Tabelle 1: Hydrolysekinetik des Carrier-Proteins in: A: 5.7N HCl; B: 4M Methansulfonsäure - jeweils bezogen auf 28 Alaninreste pro Monomer

Die Threonin- und Serinwerte wurden ebenso wie die Meßwerte für Methionin und Carboxymethyl-Cystein auf den Zeitpunkt t=O extrapoliert.

Die starke Zeitabhängigkeit der Valin- und Isoleucinwerte läßt auf Ile-Ile-, Val-Val- und Ile-Val-Verknüpfungen in der Primärstruktur schließen. Mit 5,7 N Salzsäure anstelle von Methansulfonsäure ergaben sich ähnliche, wenn auch weniger drastische Zeitabhängigkeiten der Isoleucin- und Valinwerte. Auch hier erreichten die zeitabhängigen Hydrolysen, selbst bei 72-stündiger Hydrolysedauer, noch keine konstanten Werte.

Nach Oxidation des Carrier-Proteins mit Perameisensäure wurden in einem Salzsäurehydrolysat vier Cysteinsäurereste pro Monomer gefunden. Hydrolysierte man dagegen carboxymethyliertes Protein mit Methansulfonsäure, konnte man nur zwei Carboxymethyl-Cysteine identifizieren.

Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis, daß bei Verwendung von ^{14}C-markierter Jodessigsäure zur Carboxymethylierung nur ein Einbau von 2 Carboxymethyl-Resten pro Carrier-Protein-Monomer beobachtet werden konnte (Aquila, H. unveröffentlicht). Die Aufsummierung der Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren ergibt ein M_r=29 155 für das gesamte Carrier-Protein. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit dem gelelektrophoretisch (28) bestimmten Molekulargewicht von etwa 29 000.

3.2 N- und C-terminale Analyse des Carrier-Proteins

Die direkte Dansylierung und anschließende Hydrolyse des carboxymethylierten Carrier-Proteins ergab ein negatives Resultat - kein freier N-Terminus war zu erkennen. Mit demselben Ergebnis endete der Versuch, das gesamte Carrier-Protein im Flüssigphasen-Sequenator abzubauen (Fietzek, P.) Carboxypeptidase A und B wurde verwendet, um die carboxylständigen Aminosäuren des Carriers zu identifizieren (65). Mit Carboxypeptidase A allein wurden in Suspension pro Mol Polypeptid nach 5 Minuten 0,28 Mol Valin und 0,26 Mol Phenylalanin, nach 20 Stunden 0,55 Mol Valin und 0,33 Mol Phenylalanin abgespalten. Bei der Inkubation des Carrier-Proteins in Suspension mit einem Gemisch aus Carboxypeptidase A und B wurden nach 5 Minuten pro Mol Peptid 0,50 Mol Valin, 0,42 Mol Phenylalanin und 0,54 Mol Lysin, nach 20 Stunden 0,92 Mol Valin, 0,84 Mol Phenylalanin und 1,47 Mol Lysin freigesetzt. Die Aminosäurefolge, die sich aus diesen Abbauversuchen ergab, legte folgende C-terminale Sequenz nahe: Lys-Lys-Phe-Val.

3.3 Isolierung und Charakterisierung der Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins

Die SDS-Gelelektrophorese nach Neville eines Bromcyanspaltungsansatzes ergab als Hauptkomponente ein Polypeptid, das bei der Co-Elektrophorese zusammen mit dem Soja-Trypsin-Inhibitor lief und damit ein Molekulargewicht von ca. 22 000 aufwies. Daneben waren noch einige schwächere Banden im Bereich

zwischen M_r=29 000 und 22 000, und eine schwache Bande an der Front zu beobachten. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ließ auf eine asymmetrische Verteilung der Methioninreste entlang der Polypeptidkette des Ausgangsproteins schließen mit einem großen und mehreren kleinen Bromcyanfragmenten.

Vorversuche, einen Spaltansatz, nachdem Lösungsmittel und überschüssiges Reagens im Vakuum abdestilliert worden waren, mit einer 1 m x 1 cm Sephadex G-200 Säule aufzutrennen, waren nicht sehr ermutigend. Zuvor wurde der Rückstand in 8 M Harnstoff, 1% SDS und 100 mM TRIS-HCl pH 8,0 gelöst. Nach der Rechromatographie des großen Bromcyanfragments auf derselben G-200 Säule, die mit 0,1% SDS, 100 mM TRIS-HCl, pH8,0 äquilibriert und eluiert wurde, sank die Ausbeute an gelelektrophoretisch homogenem Polypeptid mit M_r= 22 000 auf 5%. Im Verlauf der späteren Arbeit erhielt das Peptid die Bezeichnung B1. Die kleineren Peptide wurden im Anschluß an B1, aber unaufgelöst, eluiert.

Die N-terminale Analyse des in SDS chromatographierten B1 ergab nach Umsetzung mit Dansylchlorid und Hydrolyse (54) einen blockierten N-Terminus. Damit zeichnete sich folgendes ab: Bromcyan spaltet das Carrier-Protein, das einen blockierten N-Terminus besitzt, in ein Polypeptid mit M_r= 22 000 mit dem blockierten N-Terminus des Ausgangspolypeptids und in eine Anzahl kleinerer Peptide, die vom C-terminalen Bereich des Carrier-Proteins stammen.

Der Durchbruch bei der Auftrennung der Bromcyanpeptide gelang durch die Einführung des Chromatographie-Systems Bio-Gel P-30 minus 400 mesh in 80% Ameisensäure (67, 68). Schwierigkeiten bereitete lediglich, von der Herstellerfirma geeignetes Gelmaterial zu erhalten. Im Idealfall sollte es, unter dem Lichtmikroskop betrachtet, nur aus sphärischen Teilchen gleicher Größe bestehen. Ein hoher Anteil an feinem Material oder an zerbrochenen sphärischen Partikeln führte zu Druckaufbau und ungenügender Trennleistung der Gelsäule. Die Trenneigenschaften der Säulen wurden mit einem Kalibrierungsgemisch erprobt (Abb. 1,2).

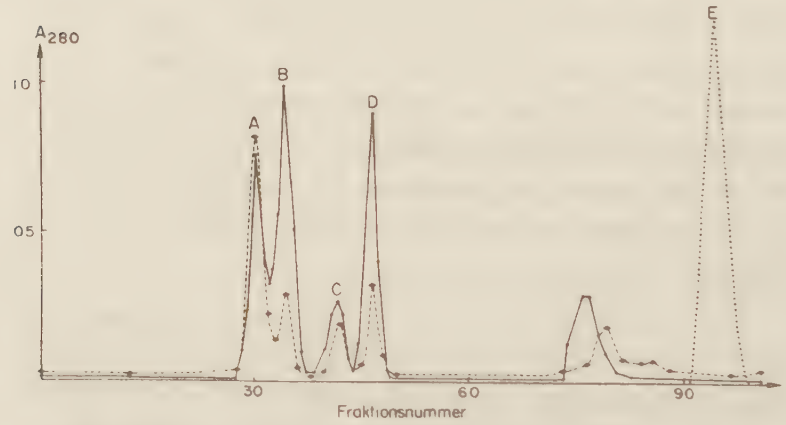


Abb.1: Eichlauf an Bio-Gel P-30 minus 400 mesh, 80% Ameisensäure (frisch gepackt).

Säulendimension: 1 m x 0,8 cm; Fraktionszeit: 30 Minuten; Fraktionsvolumen: 400 µl. Detektion: Absorption bei 280 nm (___); Refraktometerindex (---) in willkürlichen Einheiten; ^{3}H-dpm (·····).

Molekulargewichte der Eichpeptide:

A:	Rinderserum-Albumin	(1mg)	M_r = 67 000
B:	Pferdeherz-Cytochrom c	(1mg)	M_r = 12 300
C:	Trasylol	(1mg)	M_r = 6 700
D:	Melithin	(0,6mg)	M_r = 2 840
E:	$^{3}H-H_2O$	(1µCi)	M_r = 18

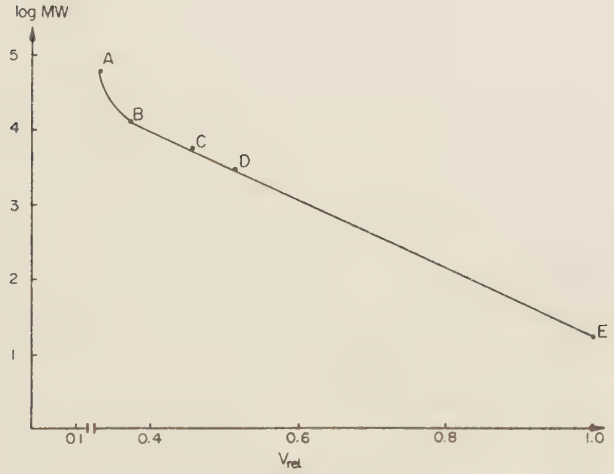


Abb. 2: Eichkurve des in Abb. 1 dargestellten Kalibrierungslaufes einer Bio-Gel P-30 minus 400 mesh-Säule in 80% Ameisensäure.

Das relative Elutionsvolumen (V_{rel}) der 4 Eichpeptide (A-D) und von ^3H-H_2O (E) ist gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte aufgetragen. Eine identische log MW/V_{rel}-Beziehung wurde mit einer Säule der Dimension 1,35 m x 0,65 cm erzielt (Ergebnis nicht abgebildet).

Die Fraktionierung eines Bromcyanspaltansatzes des Carrier-Proteins an einer Bio-Gel P-30 minus 400 mesh Säule in 80% Ameisensäure in Verbindung mit der Aminosäurezusammensetzung der Bromcyanpeptide (Tabelle 2) ist in Abb. 3 dargestellt. Im vorderen Trennbereich der Säule wurde B1 eluiert. Dieses Peptid zeigte bei der Umsetzung mit Dansylchlorid (54), daß es keine frei zugängige α-Aminogruppe besaß.

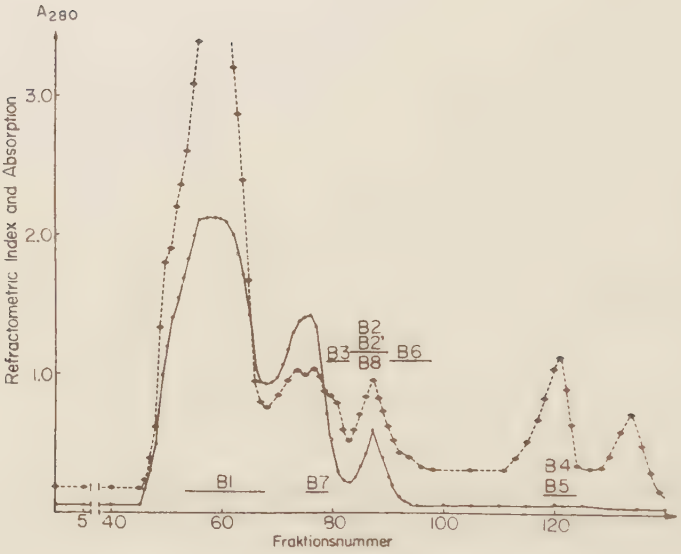


Abb. 3: Präparative Gelchromatographie der Bromcyan-peptide des Carrier-Proteins

Säulendimension: 1,35 m x 0,65 cm; Säulenpackung: Bio-Gel P-30 minus 400 mesh äquilibriert und eluiert mit 80% Ameisensäure.
Auftragsmenge: 20 mg
Fraktionszeit: 20 Minuten; Fraktionsvolumen: 320 µl.
Detektion: Absorption bei 280 nm (___); Refraktometer (---).
Die jeweils durch horizontale Striche markierten Fraktionen (B1 bis B8) von drei Parallelläufen wurden vereinigt und, wie im Ergebnisteil beschrieben, weiterbearbeitet.

Carrier-Protein	P29		B1		B2, B2'		B3		B4, B5		B6		B7		B8	
$CysSO_3H$	3.8	(4)	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
Asp	19.2	(19)	=12	(12)	1.8	(2)	1.0	(1)	0.1	-	1.0	(1)	2.9	(3)	1.1	(1)
Thr	10.9	(11)	5.3	(6)	0.3	-	2.6	(3)	-	-	0.1	-	2.0	(2)	0.1	-
Ser	13.0	(13)	8.7	(9)	1.0	(1)	1.0	(1)	-	-	0.8	(1)	1.3	(1)	0.3	-
H-Ser	-	-	0.9	(1)	1.4	(1)	0.6	(1)	=2	(2)	1.0	(1)	1.3	(1)	0.1	-
Glu	17.2	(17)	11.9	(12)	1.8	(2)	1.0	(1)	-	-	0.9	(1)	1.2	(1)	1.1	(1)
Pro	7.1	(7)	3.8	(4)	1.0	(1)	1.0	(1)	-	-	0.1	-	1.3	(1)	0.1	-
Gly	26.0	(26)	15.9	(16)	1.8	(2)	1.2	(1)	-	-	1.8	(2)	3.9	(4)	1.9	(2)
Ala	=28	(28)	18.5	(19)	1.0	(1)	3,1	(3)	-	-	1.0	(1)	3.3	(3)	1.1	(1)
Val	20.0	(20)	9.6	(10)	3.3	(3)	3.7	(4)	-	-	0.3	-	2.2	(2)	3.0	(3)
Met	5.7	(6-7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	13.4	(15)	7.9	(9)	1.5	(2)	1.1	(1)	-	-	0.9	(1)	1.2	(1)	0.9	(1)
Leu	20.0	(20)	13.4	(14)	1.2	(1)	1.0	(1)	-	-	0.1	-	1.3	(1)	1.8	(2)
Tyr	10.9	(11)	7.0	(7)	0.5	(1)	0.7	(1)	-	-	-	-	1.0	(1)	0.8	(1)
Phe	18.0	(18)	11.9	(12)	0.9	(1)	=1	(1)	-	-	0.1	-	=2	(2)	1.8	(2)
Trp	7.5	(8)	5.8	(6)	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
His	2.8	(3)	1.5	(2)	0.5	(1)	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1	-
Lys	19.2	(19)	10.6	(11)	=2	(2)	0.2	-	-	-	=1	(1)	3.6	(4)	=2	(2)
Arg	15.1	(15)	8.3	(9)	0.7	(1)	2.7	(3)	-	-	0.9	(1)	2.2	(2)	-	-
Summe	261		159		22		23		2		10		29		16	
NH_2-Terminus	(-)		(-)		Leu,Pro		Ile		H-Ser		(-)		Tyr		Gly	

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung des ADP/ATP-Carriers aus Rinderherzmitochondrien (aus Tabelle 1) und dessen Bromcyanpeptide (B1 bis B8).

Die Meßwerte von P29 und B 1 stammen von 24-, 48- und 72-stündigen Hydrolyseansätzen in 5.7N HCl oder 4N Methansulfonsäure. Die Werte für Methionin, Serin und Threonin sind auf Hydrolysezeit t=0 extrapoliert. Die Meßwerte bei P29 basieren auf 28 Alaninresten, die von B1 auf 12 Asparginsäureresten. Die Ermittlung der Zusammensetzung der kleineren Bromcyanpeptide erfolgte nach 20-stündiger Hydrolyse in 5.7N HCl. Die Werte in Klammern geben den nächsten ganzzahligen Betrag an Aminosäuren an.

Dieser Befund legte nahe, daß es sich bei B1 um den blockierten N-Terminus des gesamten Polypeptids handelte. In der vorderen Flanke dieses ersten Peaks des Elutionsdiagramms wurden in geringem Umfang Peptide eluiert, deren gelelektrophoretisch bestimmtes Molekulargewicht sich zwischen B1 und dem des Ausgangsmaterials bewegte. B1 konnte durch zweimalige Rechromatographie auf Bio-Gel P-30 minus 400 mesh in 80% Ameisensäure in gelelektrophoretisch einheitlicher Form isoliert werden (Abb. 8A). Die Ausbeute an B1 nach diesem letzten Reinigungsschritt betrug etwa 20-25%.

Die Aminosäurezusammensetzung von B1 wurde durch Extrapolation der Gehalte an den einzelnen Aminosäuren nach 24-, 48- und 72-stündiger Hydrolyse in 4 M Methansulfonsäure und 5,7 N Salzsäure zum Zeitpunkt t=0 und t=∞ bestimmt. Der Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Carrier-Protein und B1 (siehe Tabelle 2) zeigte, daß von den drei Histidinresten des gesamten Polypeptids zwei im großen Bromcyan-Bruchstück auftreten. Methionin und dessen Oxidationsprodukte Methioninsulfon und Methioninsulfoxid waren nicht vorhanden; Homoserin war mit 0,9 Mol pro Mol Peptid vertreten. Das wies darauf hin, daß es sich bei B1 um ein echtes Bromcyanpeptid handelt und nicht um ein Doppelpeptid, das durch unvollständige Spaltung an ganz oder teilweise oxidierten Methioninresten entstanden sein könnte. Die Aufsummierung der Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren ergibt für B1 ein Molekulargewicht von 17 870, verglichen mit ca. 22 000 bei der Gelelektrophorese nach Neville.

Untersuchte man die einzelnen Fraktionen des letzten UV-Peaks des Elutionsdiagramms (Abb. 3) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Laufmittel I und II), konnte man nur einen intensiven Fleck beobachten. Erst bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mit Dansylchlorid (54) konnte man erkennen, daß es sich bei diesen Fraktionen um ein Peptidgemisch handelte, das aus mindestens drei Komponenten bestand. Die Dünnschicht-Chromatographie der dansylierten Aminosäuren dieses Peptidgemisches ergab folgende Endgruppen: Leucin, Glycin und Prolin.

Dieses Peptidgemisch konnte teilweise durch Extraktion des getrockneten Materials mit Wasser aufgetrennt werden. Als wasserunlöslicher Rückstand fiel das Peptid B8 an, dessen Aminosäuresequenz am Ende dieses Kapitels behandelt wird. In Tabelle 2 ist die durchschnittliche Aminosäurezusammensetzung der wasserlöslichen Fraktion angegeben (mit B2/B2' bezeichnet).

Beim Versuch, die wasserlösliche Fraktion des Peptidgemisches, die über C-terminales Homoserin an den Träger gekoppelt war, zu sequenzieren, erhielt man eine Doppelsequenz. Die ersten fünf Abbauschritte ergaben folgende Aminosäuresequenzen: Leu-Gly-Ala-Phe-Leu und Pro-Lys-Asn-Val-His. Die mit Prolin beginnende Sequenz entsprach der Anfangssequenz des acidolytischen Fragmentes A2 (vgl. Kapitel 3.4). Im sechsten Abbauschritt trat ein unerwartetes Ereignis ein: Während die mit Prolin beginnende Teilsequenz sich analog der von A2 weiter

verfolgen ließ, kam es bei der mit Leucin beginnenden zu einem Bruch, der sich dadurch bemerkbar machte, daß sich deren Teilsequenz mit der von A2 (Pro-Lys-Asn ...) fortsetzte. In diesem sechsten Abbauschritt mußte es zur hydrolytischen Spaltung einer säurelabilen X-Pro-Bindung gekommen sein, die zur Folge hatte, daß von dem ursprünglich mit Leucin beginnenden Peptid ein Fragment der Bruttozusammensetzung (Asx, Glx, Gly, Val, Tyr, Phe, Lys) von dem immobilisierten Restpeptid abgefallen war. Daher stammen auch die Bezeichnungen B2 für das gesamte und B2' für das mit Prolin beginnende Peptid. Als Nebensequenz bei der Strukturermittlung von B2 und B2' fand man die von B8, da dieses Peptid beim Extraktionsprozeß mit Wasser in Spuren in Lösung gegangen war.

Versuche, das Gemisch B2, B2' und B8 mit verschiedenen Ameisensäure- und Essigsäure-Konzentrationen (10-30%) an Bio-Gel-Typen unterschiedlicher Porenweite (P-4-P-10) weiter aufzutrennen, scheiterten daran, daß sich die Peptide in diesen sauren Medien nicht mehr von den Säulen eluieren ließen. Elektrophoreseversuche auf Celluloseplatten bei verschiedenen pH-Werten schlugen fehl, da das Gemisch am Auftragspunkt liegen blieb.

B3 erschien im Elutionsprofil der Bromcyanpeptide als Schulter des Peaks B7. Zusätzlich wurden die einzelnen Fraktionen noch gelelektrophoretisch untersucht (vgl. Abb. 7B). Vergleicht man die Peakhöhen der Absorptionsmaxima von B7 und

B3 (Abb. 3) mit dem Gehalt an Phenylalanin und Tyrosin (Tab. 2) dieser Peptide, liegt der Schluß nahe, daß die höhere UV-Absorption von B7 auf Tryptophanresten in B7 beruhen könnte. Die Rechromatographie von B3 erfolgte an Bio-Gel P-30 in 80% Ameisensäure. Die Abb. 8B zeigt das Densitogramm einer Gelelektrophorese von homogenem B3. Die Ausbeute an reinem B3 betrug nach zwei Chromatographieschritten etwa 25%. B3, das nach N-terminaler Analyse mit einem Isoleucin beginnt, konnte nach C-terminaler Kopplung über das Homoserinlacton an den festen Träger vollständig über 23 Schritte sequenziert werden.

Schwierigkeiten bereitete dabei die endgültige Zuordnung der Aminosäurereste im C-terminalen Bereich Arg-Arg-Met-(Met): Zunächst konnte nicht eindeutig entschieden werden, ob das dritte Arginin das Ergebnis eines starken Überlappungssignals war oder ob es sich um die diesem Edman-Abbauschritt entsprechende Aminosäure handelte. Erschwerend kam hinzu, daß nicht nur im Abbauschritt 23, sondern auch im folgenden Homoserin identifiziert wurde. Später wurde erkannt, daß in der Tat zwei Spezies von Homoserinpeptiden isoliert und sequenziert wurden: Isoleucin $^{12'}$ bis Methionin $^{34'}$ und Isoleucin $^{12'}$ bis Methionin $^{35'}$, die durch Gelfiltration nicht fraktioniert worden waren.

Um die Sequenz in der C-terminalen Region von B3 abzusichern, wurde das Peptid am Tyrosin mit o-Iodosobenzoesäure gespalten. Dieses Reagens, von dem in der Literatur berichtet wird, daß

es spezifisch die Trp-X-Bindung spaltet (62), erwies sich auch als Tyr-X-spaltend, wenn auch mit geringerer Ausbeute (63).

Die Auftrennung eines o-Iodosobenzoesäure-Spaltansatzes von B3 an Bio-Gel P-30 minus 400 mesh/80% Ameisensäure ist in Abb. 4 dargestellt.

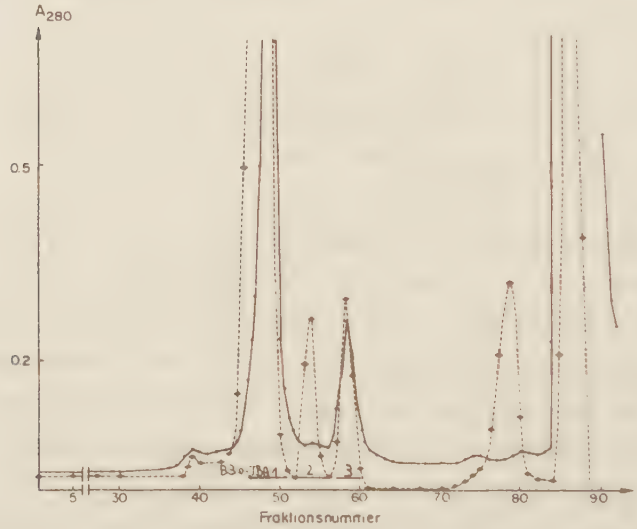


Abb. 4: Gelchromatographie des an Tyrosin mit o-Iodosobenzoesäure gespaltenen Bromcyanpeptids B3.

Säulendimension: 1,35 m x 0,65 cm; Säulenpackung: Bio-Gel P-30minus 400 mesh äquilibriert und eluiert mit 80% Ameisensäure. Auftragsmenge: 1 µ Mol o-Iodosobenzoesäure gespaltenes B3. Fraktionszeit: 30 Minuten; Fraktionsvolumen: 480 µl. Detektion: Absorption bei 280 nm (——); Refraktometer (---). Horizontale Striche unter den Peaks kennzeichnen vereinigte Fraktionen. Der sehr intensive Peak, der sowohl vom Durchfluß-Refraktometer als auch vom Photometer etwa bei der Fraktion 88 registriert wurde, stammte von dem Überschuß an Spaltreagens.

Als erster Peak (B3 o-JBA1) erschien ungespaltenes B3, dessen Tyrosin durch das Reagens weitgehend zerstört war (siehe Tabelle 3).

	B3 o-JBA1		2		3	
Asp	1.1	(1)	1.1	(1)	0.3	-
Thr	2.7	(3)	1.1	(1)	2.0	(2)
Ser	1.1	(1)	0.3	-	1.0	(1)
H-Ser	1.1	(1)	1.1	(1)	0.2	-
Glu	1.0	(1)	0.2	-	1.1	(1)
Pro	1.0	(1)	1.0	(1)	0.2	-
Gly	1.1	(1)	0.3	-	1.1	(1)
Ala	3.1	(3)	0.4	-	3.2	(3)
Val	3.5	(4)	1.1	(1)	3.1	(3)
Ile	1.0	(1)	0.2	-	1.0	(1)
Leu	1.1	(1)	0.2	-	=1	(1)
Tyr	0.3	(1)	0.1	-	-	(1)
Phe	=1	(1)	=1	(1)	-	-
Lys	0.3	-	0.2	-	0.1	-
Arg	2.9	(3)	2.8	(3)	0.5	-

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung des durch o-Iodosobenzoesäure (o-JBA) an Tyrosin gespaltenen Bromcyanpeptids B3 (basierend auf 1 Phenylalanin in der ungespaltenen Peptidfraktion (B3 o-JBA1).

Daran anschließend wurde B3 o-JBA2 eluiert, dessen Aminosäurezusammensetzung der des C-terminalen Nonapeptids von B3 entsprach. Die Sequenzierung von B3 o-JBA2 ergab lückenlos die C-terminale Aminosäuresequenz des ungespaltenen Ausgangspeptids B3. Die Aminosäurezusammensetzung von B3 o-JBA3 entsprach der des N-terminalen, 14 Aminosäurereste langen Bereiches von Isoleucin bis Tyrosin. Dieses Peptid wurde nicht sequenziert.

Alle drei Peptide wurden auch durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Platten in Laufmittel I nach dem Ansprü-

hen mit Reindels Reagens als jeweils 1 Fleck mit ähnlichen R_f-Werten identifiziert. Die Auftrennung des o-Iodosobenzoesäurespaltansatzes zeigt deutlich, daß das verwendete Gelmaterial in 80% Ameisensäure nicht nur nach Molekulargewicht erfolgt: Das Nonapeptid B3 o-JBA2 (Prolin bis Methionin) wird zwischen dem 23 Aminosäuren langen ungespaltenen Ausgangspeptid B3 und dem 14 Aminosäuren langen B3 o-JBA3 eluiert.

Sequenz von B3:
ILE-ALA-GLN-THR-VAL-THR-ALA-VAL-ALA-GLY-LEU-VAL-SER-TYR-PRO-PHE-ASP-THR-VAL-ARG-ARG-ARG-MET.

B4 und B5 enthielten freies Homoserin, das in einer Ausbeute von etwa 20-30% isoliert werden konnte. Tritt diese Aminosäure als "Fragment" bei der Bromcyanspaltung auf, bedeutet das entweder, daß ein Methioninrest am N-terminalen Ende des Ausgangspeptids existiert oder eine Anhäufung von Met-Met-Bindungen in der Polypeptidkette vorliegt. Da die erste Möglichkeit aufgrund der blockierten N-Termini sowohl des Carrier-Proteins als auch des großen Bromcyanpeptids B1 ausgeschlossen werden konnte, handelte es sich in diesem Fall, wie später bei der Isolierung tryptischer Überlappungspeptide (Abschnitt 3.5) noch gezeigt wird, um eine Met-Met-Met-Brücke zwischen B3 und B6.

B6 wurde lediglich als Schulter des bereits erwähnten Peptidgemisches B2/B2'/B8 des Refraktometer-Diagramms bei der Auftrennung der Bromcyan-Peptide des Carrier-Proteins identifi-

ziert (Abb. 3). Es ließ sich bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten, sowohl in Laufmittel I als auch II, weder mit Fluram noch mit Reindels Reagens identifizieren. B6 ließ sich von Verunreinigungen durch Rechromatographie auf Bio-Gel P-30/80% Ameisensäure mit einer Ausbeute von etwa 25-35% isolieren. Die N-terminale Analyse dieses Dekapeptids nach der Umsetzung mit Dansylchlorid ergab, daß es sich bei B6 um ein N-terminal blockiertes Peptid handelte.

Die direkte Sequenzierung von B6 nach Ankopplung über dessen Homoserinlacton an den festen Träger mißlang. Die Aminosäurezusammensetzung von B6 (Tab. 2) mit einem Lysin- und einem Argininrest legte nahe, B6 mit Trypsin zu spalten. Die Auftrennung der tryptischen Peptide von B6 erfolgte an einer Bio-Gel P-2-Säule, die mit 10% Essigsäure äquilibriert und eluiert wurde (Abb. 5). Die gleiche Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen B6T1, 2, 3 und das gleiche Verhalten bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten in Laufmittel I zeigten, daß es sich um eine Spezies handelte. Stellvertretend ist in Tabelle 4 die Aminosäureanalyse von B6T1 abgebildet. Das Fragment B6T1 enthielt einen Homoserin-Rest; ein Hinweis, daß es sich bei diesem Spaltpeptid um das C-terminale Hexapeptid des Bromcyanpeptids B6 des Carrier-Proteins handelte. Nach der Fixierung dieses Hexapeptids an den festen Träger über dessen Homoserinlacton konnte es vollständig sequenziert werden.

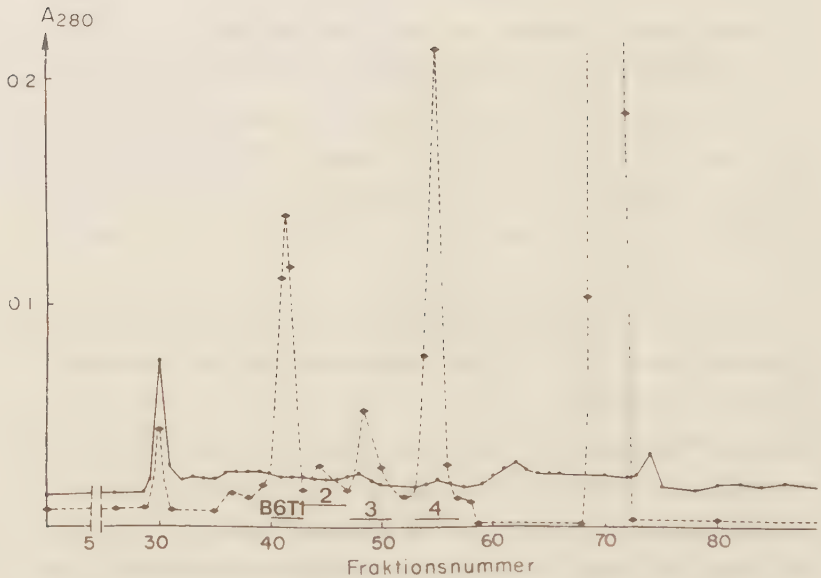


Abb. 5: Gelchromatographie der tryptischen Nachspaltung des Bromcyanpeptids B6.

Säulendimension: 1,40 m x 0,6 cm; Säulenpackung: Bio-Gel P-2 200-400 mesh äquilibriert und eluiert mit 10% Essigsäure. Auftragsmenge: 300 nMol tryptisch gespaltenes B6. Fraktionszeit: 30 Minuten; Fraktionsvolumen 480 µl. Detektion: Absorption bei 280 nm (——); Refraktometer (---).
Horizontale Striche unter den Refraktometerpeaks (B6T1 - 4) markieren vereinigte Fraktionen. Der intensive Refraktometerpeak bei Fraktion 70 bestand aus Ammoniumhydrogencarbonat, das aus dem Trypsin-Inkubationspuffer stammte.

	B6T1		B6T4	
Asp	1.0	(1)	-	-
Thr	0.1	-	-	-
Ser	0.2	-	0.9	(1)
H-Ser	1.1	(1)	0.1	-
Glu	0.1	-	1.0	(1)
Gly	1.1	(1)	1.0	(1)
Ala	1.0	(1)	-	-
Ile	0.9	(1)	-	-
Leu	0.1	-	-	-
Lys	=1	(1)	0.1	-
Arg	-	-	=1	(1)

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Spaltpeptide des Bromcyanpeptids B6.

Die unkorrigierten Meßwerte basieren auf einem Lysin bzw. einem Argininrest.

Das Tetrapeptid B6T4 fiel als letzte peptidhaltige Fraktion bei der Chromatographie des tryptischen Spaltansatzes von B6 an. Die Aminosäurezusammensetzung von B6T4 (Tab. 4) und die nicht zugängige α-Aminogruppe deuteten B6T4 als das N-terminale Peptid von B6 an. Versuche,den vermutlich durch saure Katalyse während des Spaltprozesses und der Chromatographieschritte in 80% Ameisensäure von Glutamin zu Pyroglutamat cyclisierten N-Terminus, sowohl in Lösung als auch am festen Träger mit Pyroglutamat-Aminopeptidase zu deblockieren, mißlangen.

Um wenigstens Informationen über den carboxylständigen Bereich des N-terminalen Tetrapeptids B6T4 (Ser, Glx, Gly, Arg) zu erhalten, wurde die zeitabhängige Freisetzung von Aminosäuren

nach der Zugabe eines Gemisches aus Carboxypeptidase A und B verfolgt: Nach fünfminütiger Inkubation wurde pro Mol Peptid T B6d 0,63 Mol Arginin und 0.17 Mol Glycin, und nach 24-stündiger Inkubation 0,73 Mol Arginin und 0,55 Mol Glycin abgespalten. Die Ergebnisse der Sequenzermittlung von B6 lassen sich folgendermaßen darstellen:

(GLX, SER)-GLY-ARG-LYS-GLY-ALA-ASP-ILE-MET.

B7 wurde im mittleren Fraktionsbereich der Bio-Gel P-30-Säule in 80% Ameisensäure zwischen dem N-terminalen Bromcyanpeptid B1 und B3 eluiert. Die Isolierung des gelelektrophoretisch einheitlichen Peptids B7 (Abb. 7C) gelang durch Rechromatographie an Bio-Gel P-30/80% Ameisensäure, gefolgt von einem weiteren Reinigungsschritt mit dem von Gerber et al. (69) beschriebenen System: Sephadex LH 60 mit Ameisensäure: Ethanol = 3:7 als Solvent. Bei dem zweiten Chromatographieverfahren ließen sich Peptide entfernen, die sich nach der Rechromatographie an Bio-Gel P-30/80% Ameisensäure als schwache Schulter im ansteigenden Bereich des Densitogramms des Gels von B7 abzeichneten. Die Ausbeute nach den drei Reinigungsschritten betrug 15-20%. Im Gegensatz zu dem bereits erwähnten Bromcyanpeptid B3 und dem Peptidgemisch B2/B2'/B8 blieb B7 bei der Dünnschichtchromatographie sowohl auf Cellulose- als auch auf Kieselgelplatten in Laufmittel I und II am Start liegen. Zur Untersuchung der Homogenität der einzelnen Fraktionen eines Chromatographielaufes mußten Aliquots durch Gelelektrophorese untersucht werden.

B7, das mit einem Tyrosin beginnt und 32 Aminosäuren lang ist, konnte nach der Ankopplung über das C-terminale Homoserinlacton an den festen Träger 24 Schritte weit sequenziert werden. In einem Parallelabbau wurde das fixierte Peptid B7 am Träger mit Trypsin inkubiert. Die Sequenzierung des auf diese Weise erhaltenen tryptischen C-terminalen Dipeptids ergab: Gly-Met. Als Nebensequenz, mit etwa 5% Ausbeute, konnte Asn-Val-Leu-(Arg)-Gly-Met identifiziert werden. Damit ließ sich für B7 folgende Teilsequenz erstellen:

Partialsequenz von B7:
TYR-THR-GLY-THR-VAL-ASP-CYS-TRP-ARG-LYS-ILE-ALA-LYS-ASP-GLU-GLY-PRO-LYS-ALA-PHE-PHE-LYS-GLY-ALA-(SER, ASN, VAL, LEU, ARG)-GLY-MET.

Der Cysteinrest im 7. Abbauschritt von B7, der von einem Asparginsäure- und einem Tryptophanrest flankiert war, wurde als Carboxymethyl-Cystein identifiziert. Die Schließung der Sequenzlücke der Aminosäuren in der Klammer gelang erst mit Hilfe tryptischer Überlappungspeptide (siehe Abschnitt 3.3).

Aus dem Vorpeak von B7 ließ sich analog B7 nach Rechromatographie an Bio-Gel P-30 und Sephadex LH 60 ein Peptid isolieren, das sowohl aufgrund der geringeren Laufstrecke bei der Gelelektrophorese als auch in der Aminosäurenzusammensetzung ein höheres Molekulargewicht als B7 aufwies. Es erbrachte bei der Sequenzierung, sowohl vor, als auch nach der Inkubation mit Trypsin am festen Träger, dasselbe Ergebnis wie B7. Diese Befunde sprechen dafür, daß es sich dabei

im wesentlichen um B7 handelt, das zusammen mit einem Peptid eluiert wurde, das beim Edman-Abbau nicht angegriffen wurde. Die Aminosäuredifferenz zu B7 (je 1 Glx, Gly, Ala, Val, Ile, Leu) ließ sich auch nicht dem in der Primärstruktur vorangehenden Bromcyanpeptid B6 zuordnen, das nach den Chromatographieschritten einen blockierten N-Terminus aufwies.

Das bereits erwähnte Peptidgemisch B2/B2'/B8 wurde zwischen dem 3 Argininreste enthaltenden Bromcyanpeptid B3 und dem N-terminal blockierten B6 eluiert. Der wasserunlösliche Rückstand B8 (SDS-Gelelektrophorese: Abb. 7D), der laut Aminosäureanalyse (Tabelle 2) 2 Lysinreste und kein Homoserin enthielt, wurde über die Thioharnstoffbindung zwischen Lysin und dem p-Phenylen-diisothiocyanat-Derivat von 3-Aminopropyl-Glas immobilisiert. Der Edman-Abbau lief über 13 Schritte (Abb. 6).

Das vom Träger abgefallene Restpeptid, das auf Lysin folgte, wurde mit 5.7 N Salzsäure hydrolysiert und der Aminosäureanalyse unterworfen: Phenylalanin und Valin waren die einzigen Aminosäurereste, die in äquimolaren Mengen identifiziert werden konnten. Der zweite Lysinrest verblieb konvalent am Träger gebunden. Vergleicht man den C-terminalen Bereich des Bromcyanpeptids B8 mit dem Ergebnis der Inkubationsversuche des Carrier-Proteins mit Carboxypeptidase A und B (siehe Abschnitt 3.2), stellt man unschwer fest, daß es sich bei B8 um das C-terminale Fragment des gesamten Proteins handelt. B8 wurde noch zusätzlich C-terminal an den Träger gekoppelt und sequenziert.

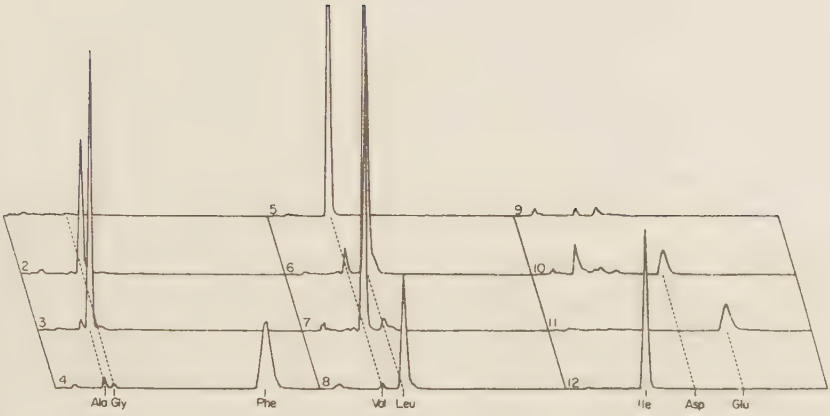


Abb. 6: Gaschromatogramme der ersten zwölf Abbauschritte von B8 nach Immobilisierung des Peptids an DITC-Glas (über freie NH_2-Gruppen).

Gerät: Shimadzu GC6A FPD ausgerüstet mit einem schwefelsensitiven flammenphotometrischen Detektor. Isothermer Lauf bei 210° mit PTH-Chrom-S (Serva) als stationäre Phase. Asparginsäure und Glutaminsäure im elften bzw. zwölften Abbauschritt wurden als Methylester identifiziert (Derivatisierung mit 1.5 N HCl in trockenem Methanol). Tyrosin im neunten Schritt wurde massenspektometrisch bestimmt (Finnigan 3200). Das N-terminale Glycin und Lysin im 14. Schritt verblieben bei dieser Kopplungsmethode konvalent am Träger gebunden und konnten nicht erfaßt werden.

Sequenz von B8:

GLY-GLY-ALA-PHE-VAL-LEI-VAL-LEU-TYR-ASP-GLU-ILE-LYS-LYS-PHE-VAL.

In einem Fall konnte bei der Sequenzierung des wasserlöslichen Überstandes des Bromcyanpeptidgemisches B2, B2', B8 ein Peptid beobachtet werden, das sich von B6 nur durch ein zusätzliches N-terminales Methionin unterschied. Es konnte ohne Pyroglutaminsäurebildung im zweiten Abbauschritt sequenziert werden.

Beynum et al. (70) beobachteten ebenfalls eine unvollständige Spaltung von Met-Gln-Verknüpfungen bei der Ermittlung der Primärstruktur des Hüllproteins des Alphaalpha-Mosaik-Virus. Bei der Bromcyanspaltung des Hüllproteins betrug der Anteil an ungespaltenem H-Ser-Met etwa 20%. Nach erfolgter Spaltung der Met-Gln-Bindung kam es, ähnlich wie bei B6 des Carrier-Proteins, zu einer Cyclisierung des Glutaminrestes zu Pyroglutaminsäure.

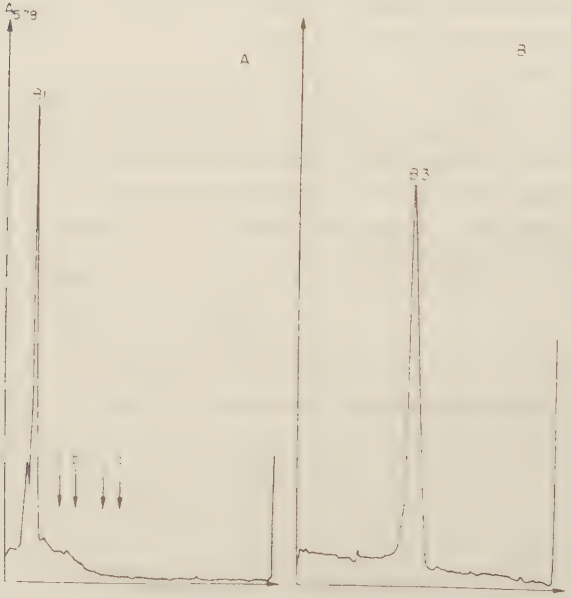


Abb.7

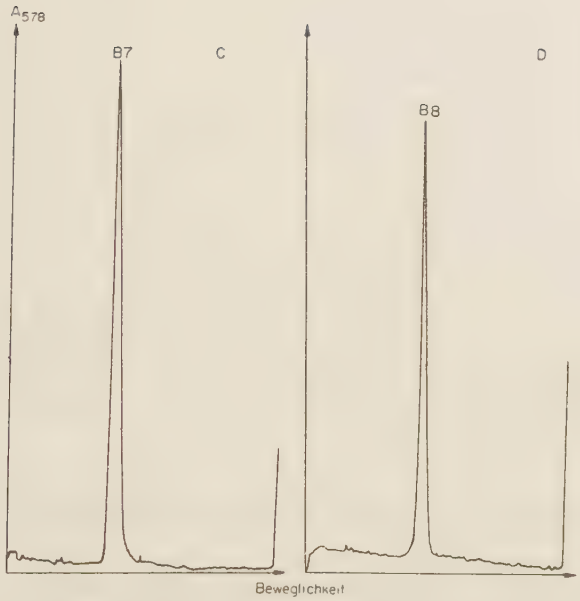


Abb. 7: SDS-Gelelektrophorese der isolierten Bromcyanpeptide des ADP/ATP-Carriers in Gegenwart von 8M Harnstoff (49).

Densitometrische Aufzeichnung der Coomassie-Blaufärbung der Peptidbanden bei 578nm.

A: das N-terminal blockierte Peptid B1.
a, b, c und d geben die Positionen der in einem Parallelgel aufgetrennten Eichpeptide Cytochrom c (a:M_r= 12 300) und der Bromcyanpeptide von Cytochrom c an (b, c, d M_r= 7800, 2800 und 1800).

B: das Bromcyanpeptid B3

C: das Bromcyanpeptid B7

D: das Bromcyanpeptid B8

Das aus den Bromcyanpeptiden B2 und B2' bestehende Gemisch und das Decapeptid B6 wurden wegen der geringen Molekulargewichte beim Anfärben der Gele herausgewaschen und ließen sich nicht erfassen.

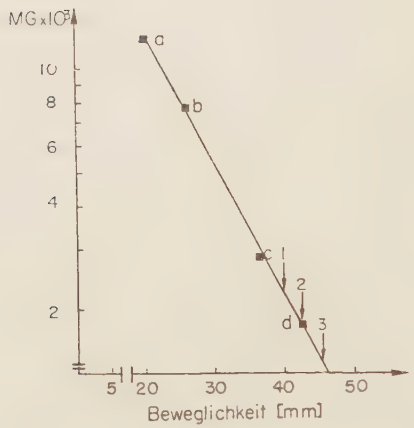


Abb. 8: Molekulargewichtsabschätzung der Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins.

Der dekadische Logarithmus der Molekulargewichte wurde gegen die relative Beweglichkeit der Peptide aufgetragen (aus Abb. 7). a, b, c und d markieren die Laufstrecken der Eichpeptide Cytochrom c (M_r= 12 300) und der Bromcyanpeptide von Cytochrom c (M_r= 7800, 2800, 1800). Die vertikalen Pfeile 1, 2 und 3 markieren die Lage der Peptidbanden von B7, B3 und B8. Die Bande des N-terminalen Peptids B1 lag außerhalb des linearen Bereichs der Eichgeraden und wurde deshalb nicht eingezeichnet.

In Abbildung 8 wurde die elektrophorische Beweglichkeit einer Eichmischung bestehend aus Cytochrom c und den Cromcyanpeptiden von Cytochrom c gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte dieser Peptide aufgetragen (Meßdaten aus Abb. 7A). Zusätzlich wurden in Abb. 8 auf dieser Eichgeraden die Wanderungsstrecken der Bromcyanpeptide B3,

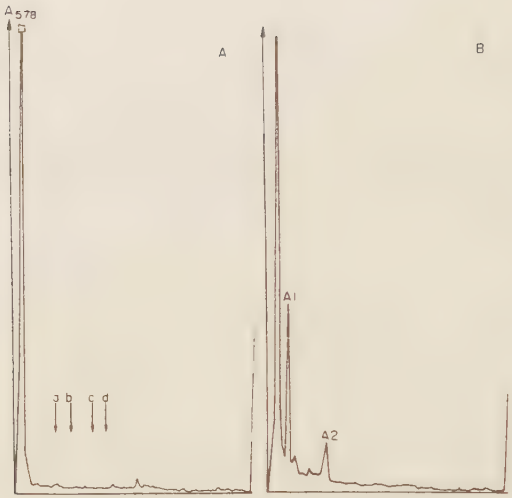
B7 und B8 des Carrier-Proteins eingezeichnet (aus Abb. 7B, C,D). Die daraus resultierenden Molekulargewichtsabschätzungen von B3, B7 und B8 lagen in allen drei Fällen niedriger als aufgrund der Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide erwartet worden war:

	M_r gelelektrophoretisch	MG Sequenz
Meßpunkt 1 (B7)	2200	3700
Meßpunkt 2 (B3)	1800	2500
Meßpunkt 3 (B8)	1400	2000

3.4 Limitierte saure Hydrolyse des Carrier-Proteins

Ziel von Vorversuchen war es, geeignete Spaltbedingungen zu finden, die bei hohen Spalt- und Trennausbeuten zu einer begrenzten Anzahl definierter Bruchstücke führen sollten. Zu diesem Zweck wurde das Carrier-Protein sowohl in 80% Ameisensäure gelöst als auch in 1 N Salzsäure suspendiert.

Der Verlauf der sauren Fragmentierung wurde bei 37°, 56° und 80° in einem Zeitbereich zwischen 5 Minuten und 4 Stunden gelelektrophoretisch verfolgt. Optimale Spaltbedingungen, d.h. eine geringe Anzahl charakteristischer Bruchstücke, wurden bei einstündigem Erhitzen bei 80° in 80% Ameisensäure erreicht (Abb. 9). Bei 37° war das Protein im untersuchten Zeitbereich stabil; ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei 56°C bis zum Zeitpunkt von einer Stunde.



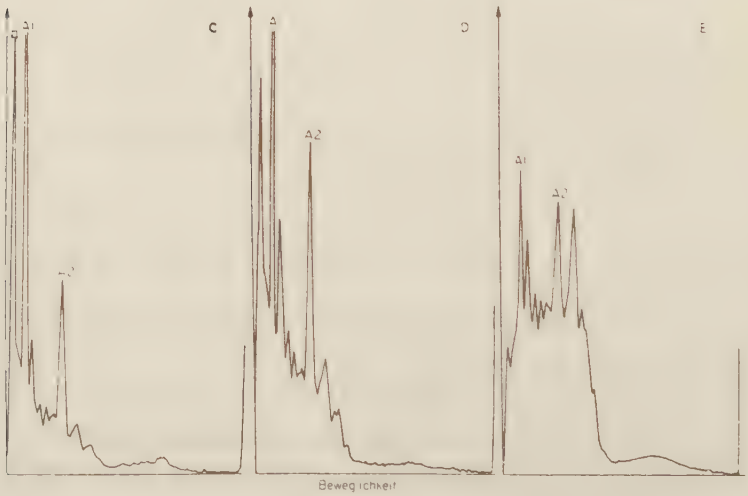


Abb. 9

Abb. 9: Zeitabhängigkeit der Hydrolyse des ADP/ATP-Carriers in 80% Ameisensäure bei 80°C.

Densitometrische Aufzeichnung der Coomassie-Blaufärbung der Peptidbanden bei 578 nm

A: ungespaltenes Carrier-Protein (□); die vertikalen Pfeile markieren die Lage der Banden der Eichpeptide (a: Cytochrom c M_r= 12 300; b, c und d Bromcyanpeptide von Cytochrom c mit M_r= 7800, 2800 und 1800).
B: Inkubationszeit 5 Minuten
C: Inkubationszeit 30 Minuten
D: Inkubationszeit 1 Stunde
E: Inkubationszeit 3 Stunden.

Ein vergleichbares Spaltmuster ergab sich bei vierstündigem Erhitzen bei 56° und bei einstündigem Erhitzen bei 80°C. Der höhere Temperaturwert von 80° wurde für präparative Spaltansätze deswegen gewählt, weil der Anteil an unfragmentiertem Carrier-Protein bei einstündigem Erhitzen bei 80° geringer war als bei vierstündigem Erhitzen bei 56°C. Außerdem war die Ausbeute des acidolytischen Hauptbruchstücks A2 bei 80° größer als bei 56°.

Wenn man 1 N Salzsäure als saures Spaltmedium einsetzte, ergab sich zum einen der Nachteil der geringen Löslichkeit des Polypeptids in verdünnter Salzsäure, zum anderen führte das Erwärmen in der verdünnten Mineralsäure vor allem bei längerer Einwirkungszeit und im höheren Temperaturbereich zu einer Vielzahl von Banden.

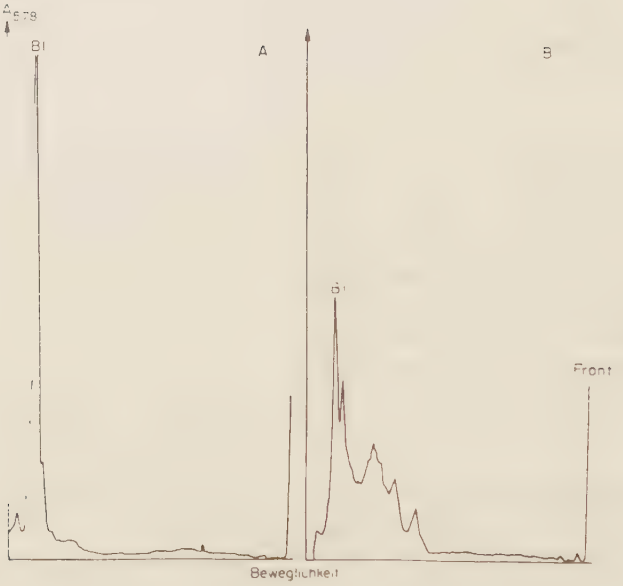


Abb. 10: SDS-Gelelektrophorese eines Hydrolyseansatzes von B1 in 80% Ameisensäure bei 80°C.

Densitometrische Aufzeichnung der Coomassie-Blaufärbung der Peptide bei 578 nm.

A: Hydrolysezeit 5 Minuten

B: Hydrolysezeit 3 Stunden.

Ein ähnliches Bild erhielt man, wenn man das Carrier-Protein oder das N-terminale Bromcyanpeptid B1 bei 80°C über 2,5 Stunden hinaus in 80% Ameisensäure erwärmte: Die wenigen charakteristischen Proteinbanden bei der Gelelektrophorese verschwinden zugunsten einer großen Anzahl teilweise gar nicht mehr aufgelöster kleiner Banden (Abb. 10).

Die Abbildung 11 zeigt das Elutionsdiagramm eines sauren Spaltansatzes, aufgetrennt an einer Bio-Gel P-30-Säule, die mit 80% Ameisensäure eluiert wurde.

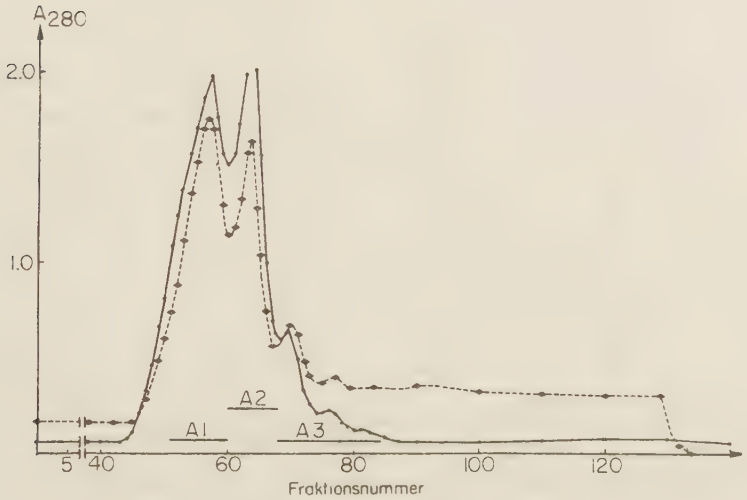


Abb. 11: Präparative Auftrennung eines durch limitierte saure Hydrolyse gewonnenen Spaltansatzes des Carrier-Proteins.

Säulendimension: 1,35 m x 0,65 cm; Säulenpackung: Bio-Gel P-30 minus 400 mesh äquilibriert und eluiert mit 80% Ameisensäure. Auftragsmenge: 20 mg. Fraktionszeit: 20 Minuten, Fraktionsvolumen: 320 µl. Detektion: Absorption bei 280 nm (——); Refraktometer (---).
Horizontale Striche unter den einzelnen Peaks (A1 bis A3) geben vereinigte Fraktionen an. Drei Parallelläufe von je 20 mg wurden nach der Vereinigung der entsprechenden Fraktionen rechromatographiert.

In Tabelle 5 ist die Aminosäurezusammensetzung der beiden Hauptfragmente wiedergegeben.

	A1		A2	
$CysSo_3H$	n.d.		0,8	(1)
Asp	=12	(12)	7.1	(7)
Thr	5.5	(6)	5.1	(5)
Ser	6.7	(8)	4.0	(4)
Glu	11.7	(12)	4.5	(4)
Pro	4.0	(4)	2.5	(3)
Gly	15.6	(16)	9.0	(9)
Ala	17.6	(18)	=8	(8)
Val	10.5	(11)	8.7	(11)
Met	-	-	4.4	(6)
Ile	8.6	(9)	5.5	(6)
Leu	11.6	(12)	4.5	(4)
Tyr	6.7	(7)	2.9	(3)
Phe	12.3	(12)	5.2	(5)
Trp	n.d.		3.1	(3)
His	1.5	(2)	1.2	(1)
Lys	11.2	(11)	7.5	(8)
Arg	8.9	(9)	5.6	(6)

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung der acidolytischen Fragmente A1 und A2 des ADP/ATP-Carriers.

Die Meßwerte stammen von 24-, 48- und 72-stündigen Hydrolyse-Ansätzen in 6N HCl oder 4M Methansulfonsäure. Die Serin-, Threonin- und Methioninwerte sind auf Hydrolysezeit t=0 extrapoliert. Die A2-Werte in Klammern entsprechen der Zusammensetzung entsprechend der Primärstruktur.

Das acidolytische Hauptspaltprodukt A2 zeigte bei der Gelelektrophorese ein M_r= 7000 (Abb. 12, 13). Es konnte nach Rechromatographie mit einer Ausbeute von 25-40% isoliert werden. Prolin, der N-Terminus von A2, ließ auf die saure Spaltung einer Asx-Pro-Bindung schließen. Die Molekulargewichtsabschätzung von A2 an einer frisch gepackten und mit Modellpeptiden geeichten Bio-Gel P-30-Säule/80% HCOOH ergab den

Wert von 10 000 - verglichen mit 10 775 als Ergebnis der Aminosäuresequenz von A2. Bei höherem Molekulargewicht im Elutionsprofil konnte das Peptid A1 isoliert werden, das bei der Gelelektrophorese nach Neville (30) ein Molekulargewicht von etwa 23 000 zeigte (SDS-Gelelektrophorese: Abb. 12). Die N-terminale Analyse von A1 ergab, daß A1 den blockierten N-Terminus des Ausgangsmaterials trug. Die Ausbeute an A1 nach einem weiteren Gelchromatographieschritt war niedrig: sie bewegte sich zwischen 5 und 10%.

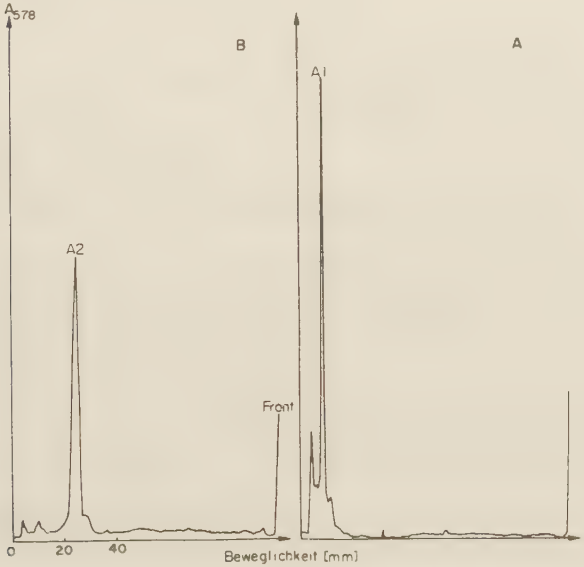


Abb. 12: SDS-Gelelektrophorese der isolierten acidolytischen Fragmente A1 und A2 des ADP/ATP-Carriers.
Densitometrische Aufzeichnung der Coomassie-Blaufärbung der Peptidbanden bei 578 nm.
A: Das N-terminale Peptid A1 mit M_r= 23 000 (nicht vollständig von ungespaltenem Carrier-Protein abgetrennt)
B: das C-terminale Peptid A2.

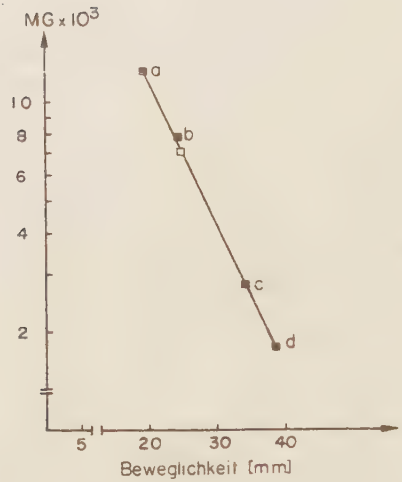


Abb. 13: Molekulargewichtsabschätzung des acidolytischen Peptids A2 des Carrier-Proteins.

Der dekadische Logarithmus der Molekulargewichte ist gegen die relative Beweglichkeit der Peptide aufgetragen (aus Abb. 12). a, b, c und d kennzeichnen die Positionen der Eichpeptide (■) Cytochrom c (M_r= 12 300) und der Bromcyanpeptide von Cytochrom c (M_r= 7800, 2800 und 1800). Der gelelektrophoretisch ermittelte Molekulargewichtswert von A2 (□) liegt mit M_r= 7000 deutlich unter dem Wert, der sich aus der Primärstruktur dieses Peptids ergibt (M_r= 10 600).

Das N-terminale Peptid A2 mit M_r= 23 000 befindet sich außerhalb des linearen Teils der Eichgeraden und wurde deshalb nicht eingezeichnet.

Um einen ersten Überblick über den molekularen Aufbau des acidolytischen Staltpeptids A2 zu erhalten, wurden 200 nMol an dem p-Phenylen-diisothiocyanat-Derivat von 3-Aminopropyl-

Glas immobilisiert und über 34 Schritte abgebaut, bis die Ergebnisse zweifelhaft wurden.

Partialsequenz von A2:

```
                    5'                    10'
PRO-LYS-ASN-VAL-HIS-ILE-ILE-VAL-SER-TRP-MET-ILE-ALA-GLN-
                  A2                              ←———————

15'                 20'                   25'
THR-VAL-THR-ALA-VAL-ALA-GLY-LEU-VAL-SER-TYR-PRO-PHE-ASP-
————————————————————B3————————————————————————————————————

    30'
THR-VAL-ARG-ARG-ARG-MET
———————————————————————→
```

Dieser Abbau ermöglichte es, die ersten 34 N-terminalen Aminosäurereste von A2 zu lokalisieren, einschließlich zweier Methionine in Position 11' und 34', die die erste Überlappung zwischen A 2 und B3 ermöglichte. Bei der Sequenzierung von A2 bis zum Abbauschritt 34 ergaben sich, außer im Bereich der wiederholt auftretenden Arginine in Position 31' bis 33' (siehe Abschnitt 3.1), keine Schwierigkeiten.

Spaltet man A2 mit Bromcyan nach, erhält man ein ähnliches Elutionsdiagramm wie bei der Bromcyanspaltung des Carrier-Proteins (Abbildung 14).

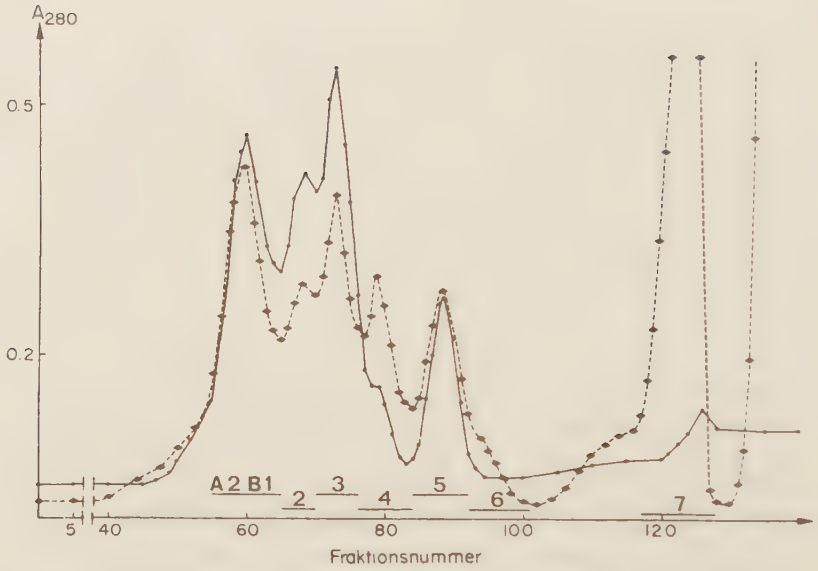


Abb. 14: Gelchromatographie eines Bromcyan-Spaltansatzes des acidolytischen Fragmentes A2

Säulendimension: 1,35 m x 0,65 cm; Säulenpackung: Bio-Gel P-30minus 400 mesh äquilibriert und eluiert mit 80% Ameisensäure.
Auftragsmenge: 200 nMol mit Bromcyan gespaltenes A2;
Fraktionszeit: 20 Minuten; Fraktionsvolumen: 320 µl.
Detektion: Absorption bei 280 nm (——); Refraktometer (---).
Horizontale Striche unter den UV- und Refraktometerpeaks kennzeichnen die vereinigten Fraktionen, deren Aminotermini und Aminosäurezusammensetzung ohne weitere Reinigungsschritte ermittelt wurden.

In Tabelle 6 ist die Aminosäurezusammensetzung der Bromcyanpeptide A2B3 bis A2B7 von A2 angegeben. Zum Vergleich sind jeweils in Klammern die Gehalte der entsprechenden Bromcyanpeptide B2' bis B8 des gesamten Carrier-Proteins aufgeführt (erhalten mit Hilfe der Sequenzdaten). A2B1 enthielt nur partiell gespaltenes Ausgangsmaterial und A2B2 hatte eine ähnliche Zusammensetzung wie A2B3 (Daten nicht abgebildet).

	A2B3 (B7)	A2B4 (B3)	A2B5 H_2O-Ex (B2')	A2B5 Rückst. (B8)	A2B6 (B6)	A2B7 (B4, B5)
Asp	3.0 (3)	1.2 (1)	1.1 (1)	1.2 (1)	1.1 (1)	0.2 (-)
Thr	2.2 (2)	2.8 (3)	0.3 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	- (-)
Ser	1.4 (1)	1.0 (1)	0.3 (1)	0.3 (-)	0.9 (1)	0.1 (-)
H-Ser	0.5 (1)	0.3 (1)	0.4 (1)	- (-)	1.0 (1)	2.0 (2)
Glu	1.2 (1)	1.1 (1)	- (-)	0.9 (1)	1.0 (1)	0.1 (-)
Pro	1.3 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	0.3 (-)	- (-)	- (-)
Gly	3.7 (4)	1.4 (1)	- (-)	2.0 (2)	1.9 (2)	0.2 (-)
Ala	3.4 (3)	3.1 (3)	- (-)	1.0 (1)	1.1 (1)	0.1 (-)
Val	3.1 (2)	3.9 (4)	1.8 (2)	3.3 (3)	0.3 (-)	- (-)
Met	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Ile	1.7 (1)	0.9 (1)	1.9 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)	- (-)
Leu	1.3 (1)	0.9 (1)	- (-)	1.7 (2)	0.3 (-)	0.3 (-)
Tyr	1.0 (1)	0.6 (1)	0.3 (-)	0.7 (1)	- (-)	- (-)
Phe	1.8 (2)	1.1 (1)	0.3 (-)	1.7 (2)	- (-)	- (-)
His	0.3 (-)	- (-)	1.0 (1)	- (-)	0.1 (-)	- (-)
Lys	3.4 (4)	0.3 (-)	1.2 (1)	2.0 (2)	1.0 (1)	- (-)
Arg	2.4 (2)	2.9 (3)	- (-)	- (-)	0.9 (1)	- (-)
NH_2-Terminus	Tyr	Ile	Pro	Gly	-	H-Ser

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Aminosäuren der Bromcyanpeptide des acidolytischen Fragments A2

Die Werte in Klammern geben zum Vergleich die Zusammensetzung der Bromcyanpeptide B2' bis B8 des gesamten Carrier-Proteins an.

Die interessanteste Abweichung der Aminosäurezusammensetzung der Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins und des acidolytischen Fragments A2 (neben dem Fehlen des N-terminal blockierten Peptids B1) konnte man im Bereich von A2B5 beobachten: Der wässrige Extrakt des lyophiliserten Materials bestand nur aus dem mit Prolin beginnenden N-terminalen Bromcyanpeptid von A2, das bis Methionin $^{11'}$ reicht. Aminosäureanalyse und Amino-Terminus des wasserunlöslichen Rückstands von A2B5 entsprachen denen des C-terminalen Bromcyanpeptids B8 des Carrier-Proteins.

Die Bromcyanpeptide A2B3 bis A2B7 zeigten, bis auf A2B5, neben der Gelchromatographie in 80% Ameisensäure sowohl bei der Dünnschichtchromatographie in Laufmittel I und II als auch bei der Gelelektrophorese nach Swank und Munkres (49) identisches Verhalten mit den entsprechenden Bromcyanpeptiden B2' bis B8 des gesamten Proteins.

Da es sich bei der Bromcyanspaltung des acidolytischen Spaltpeptids A2 nur um einen analytischen Spaltansatz von 200 nMol handelte, wurden die mit einer Spalt- und Trennausbeute von 20% bis 30% anfallenden Peptide nicht weiter sequenziert.

Das in geringer Ausbeute angefallene N-terminal blockierte acidolytische Spaltpeptid A1 zeigte, bis auf kleine Abweichungen, dieselbe Aminosäurezusammensetzung wie das N-terminale Bromcyanpeptid B1 des ungespaltenen Ausgangsproteins (vgl. Tab. 2 und 5). Die geringen Abweichungen rührten daher, daß A1 selbst nach drei Chromatographieschritten noch mit

ungespaltenem Material kontaminiert war.
Der Bereich A3 des Elutionsdiagramms des acidolytischen Spaltansatzes des Carrier-Proteins (siehe Abb. 11) enthielt eine Vielzahl kleinerer Peptide. Eine weitere Auftrennung der jeweils gelelektrophoretisch homogenen Fraktionen mißlang, obwohl sie sich bei N-terminaler Analyse und bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten in Laufmittel I als heterogen erwiesen. Als Trennmaterial wurden die Polyacrylamidgeltypen P-2, P-6 und P-10 mit verschiedenen Konzentrationen an Ameisen- und Essigsäure als Elutionsmittel verwendet. Das von Gerber und Khorana (77) beschriebene System Sephadex LH 60 mit Ameisensäure / Ethanol als Elutionsmittel brachte keine Fortschritte. Die selektive Extraktion der getrockneten Fraktionen mit ansteigenden Konzentrationen sowohl an Salzsäure (50 mM bis 6 N) als auch an Pyridin (0,5 - 100 Vol.%) blieb erfolglos.

.5 Isolierung und Charakterisierung tryptischer Überlappungspeptide

Das acidolytische Hauptspaltpeptid A2 enthält 6 Arginin- und 8 Lysinreste als Angriffspunkte für einen tryptischen Abbau (Tab. 5). Durch die Blockierung der Lysinreste mit Citraconsäureanhydrid sollte die Spaltung mit Trypsin auf die Argininreste beschränkt bleiben. Das Trennproblem der auf diese Weise erhaltenen Spaltpeptide von A2 ließ sich zusätzlich dadurch vereinfachen, daß 3 Argininreste in dem Cluster $Arg^{31'}$-Arg-$Arg^{33'}$ im Bereich des Bromcyanpeptids B3 auftraten.

In Abbildung 15 ist das Elutionsdiagramm eines auf Argininreste beschränkten typischen Abbaus des acidolytischen Spaltpeptids A2 an einer Bio-Gel P-30/80% Ameisensäure-Säule wiedergegeben.

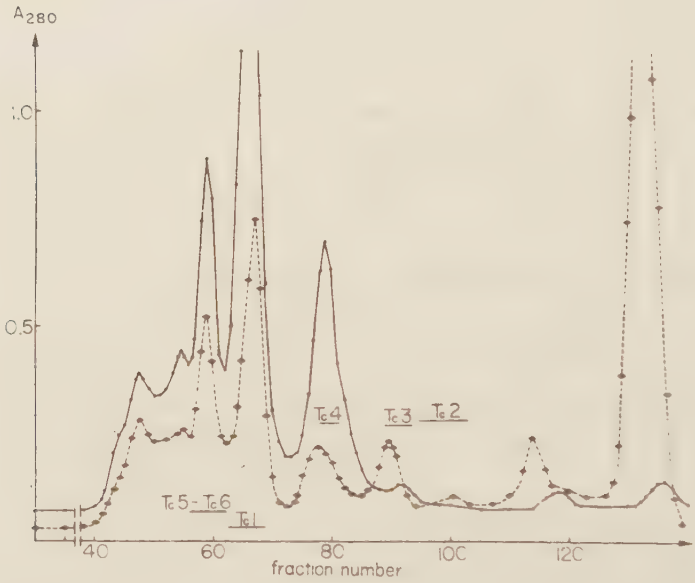


Abb. 15: Gelchromatographie der tryptischen Nachspaltung von citraconyliertem A2.

Säulendimension: 1,35 m x 0,65 cm; Säulenpackung: Bio-Gel P-30minus 400 mesh äquilibriert und eluiert mit 80% Ameisensäure.
Auftragsmenge: 500nMol tryptisch gespaltenes A2.
Fraktionszeit: 20 Minuten; Fraktionsvolumen 320 µl.
Detektion: Absorption bei 280 nm (——); Refraktometer (--).
Horizontale Striche unter den Peptidpeaks markieren vereinigte Fraktionen.

Die vereinigten Fraktionen sind durch waagrechte Striche gekennzeichnet. Die Aminosäurezusammensetzung und die N-terminalen Aminosäuren der vereinigten Fraktionen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Uneinheitliche Endgruppen und Aminosäureanalysen deuteten auf Peptidgemische der vereinigten Fraktionen hin.

Frakt.	57-62 (T_C5-T_C6)	63-69 (T_C1)	79-81 (T_C4)	90-95 (T_C3)	97-103 (T_C2)
Asp	3.1 (3)	=3.0 (2)	=3 (2)	0.4 (-)	0.3 (-)
Thr	0.8 (-)	3.0 (3)	1.9 (2)	0.2 (-)	0.4 (-)
Ser	1.2 (2)	2.0 (2)	0.9 (-)	1.0 (1)	0.2 (-)
Glu	1.7 (2)	1.4 (1)	1.3 (-)	=1 (1)	0.2 (-)
Pro	1.2 (1)	2.3 (2)	0.9 (-)	- -	- -
Gly	4.2 (5)	2.3 (1)	3.8 (2)	1.1 (1)	0.5 (-)
Ala	3.4 (5)	4.0 (3)	2.1 (1)	0.4 (-)	0.3 (-)
Val	3.3 (3)	5.9 (5)	1.5 (1)	0.3 (-)	0.2 (-)
Met	0.1 (1)	1.1 (1)	0.8 (1)	1.5 (3)	- -
Ile	1.6 (2)	2.5 (3)	1.7 (1)	0.2 (-)	0.1 (-)
Leu	2.2 (3)	1.4 (1)	1.1 (-)	0.2 -	0.2 (-)
Tyr	0.9 (1)	1.2 (1)	1.3 (1)	- -	- -
Phe	2.8 (4)	1.6 (1)	1.5 (-)	0.1 -	0.1 (-)
His	0.1 (-)	0.8 (1)	- -	- -	- -
Lys	4.2 (6)	2.2 (1)	2.3 (1)	0.2 -	0.5 (-)
Arg	=1 (1)	1.5 (1)	0.8 (1)	1.3 (1)	=2 (2)
NH_2-Term.	Lys	Pro,Lys	Lys,Gly	Met	Arg

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung und N-terminale Endgruppen der vereinigten Fraktionen eines tryptischen Spaltansatzes von citraconyliertem A2 (aus Abb. 15).

In Klammern sind die Symbole und Aminosäuregehalte der in den jeweiligen vereinigten Fraktionen enthaltenen Hauptkomponenten angegeben.

Da die tryptischen Peptide von A2 ähnliche Löslichkeitsprobleme aufwarfen wie die Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins, wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet (eine Ausnahme bildete lediglich T_c3, das noch einmal an einer Bio-Gel P-30/80% Ameisensäure-Säule chromatographiert wurde).

Die Sequenzierung der einzelnen Fraktionsbereiche war dadurch möglich, daß sie jeweils aus einer Haupt- und einer Nebenkomponente bestanden. Die Bezeichnung der Fraktionen von Abb. 15 erfolgte nach dem im jeweiligen Fraktionsbereich eluierten Hauptpeptid. Die nun folgende Besprechung der Hauptkomponenten geschieht in der Reihenfolge, in der sie in der Sequenz von A2 vorkommen.

Das N-terminale tryptische Peptid T_c1, das von Prolin $^{1'}$ bis Arginin $^{31'}$ reichte, wurde im mittleren Trennbereich der Bio-Gel P-30-Säule als der Peak mit der intensivsten UV-Absorption eluiert. Im Fraktionsbereich war T_c1, nach N-terminaler Analyse und dem Ergebnis der Aminosäureanalyse (Tab. 7) zu etwa 30% mit dem Peptid T_c5 verunreinigt (Lysin als N-terminale Endgruppe; Lysin-, Phenylalanin-, Asparagin- und Glutaminsäuregehalt).

T_c5 ist Bestandteil des Bromcyanpeptids B7 und reichte von Lysin $^{56'}$ bis Arginin $^{76'}$. (Die Zusammenfassung der Primärstruktur von A2 erfolgt in Abb. 16 am Ende dieses Kapitels).

Da die Überlappung von B2 und B3 im Bereich des Methioninrestes 11' durch die erfolgreiche Sequenzierung des acidolytischen Spaltpeptids A2 bis zu Methionin $^{34'}$ bereits bekannt war und das tryptische Peptid T_C5 nur den Teilbereich eines einzigen Bromcyanbruchstücks darstellte, wurde das Peptidgemisch nicht sequenziert.

T_C2, das nach der Aminosäureanalyse und der Dansyl-Endgruppenbestimmung aus dem Dipeptid $^{32'}$ Arg-Arg $^{33'}$ bestand, wurde ebenfalls nicht sequenziert.

T_C3 konnte nur über den Ausschlag des Differentialrefraktometers und durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Laufmittel I) identifiziert werden. Es stellte die Verknüpfung zwischen dem C-terminalen Methioninrest des Bromcyanpeptids B3, den nur aus freiem Homoserin bestehenden B4 und B5 und dem Bromcyanpeptid B6 her, das bei der Dansyl-Endgruppenbestimmung und bei Versuchen, dieses Peptid zu sequenzieren, einen blockierten N-Terminus zeigte.

Nach der Immobilisierung von T_C3 an 3-Aminopropyl-Glas über die Carboxylat-Gruppe des C-terminalen Argininrestes 40' konnte das Peptid sequenziert werden. Bei den ersten drei Abbauschritten wurde in steigender Menge das Phenylthiohydantoin-Derivat von Methionin identifiziert. Im vierten Schritt folgten Glutamin und ein schwaches Methioninsignal. Die Ausbeuten an freigesetzten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren fielen nach dem vierten Abbauschritt (Cyclisierung von Glutamin $^{37'}$ zu Pyroglutaminsäure) ab, die folgenden drei Ami-

nosäuren konnten aber noch eindeutig zugeordnet werden.

Sequenz von T_c3:

```
    35'                    40'
MET-MET-MET-GLN-SER-GLY-ARG
-B3→ ←B4→ ←B5→ ←---------B6------
```

Der Fraktionsbereich, der T_c4 als Hauptkomponente enthielt, war mit einem weiteren Peptid verunreinigt. T_c4 war das Verbindungsglied zwischen den Bromcyanpeptiden B6 und B7; es reichte von Lysin $^{41'}$ bis Arginin $^{55'}$. Kontaminiert war T_c4 zu etwa 30-40% (Lysin und Glycin als N-terminale Aminosäuren; Aminosäureanalyse- und Sequenzierdaten) mit T_c6, das durch partielle tryptische Spaltung an Arginin $^{76'}$ entstanden war und von Glycin $^{77'}$ bis zum C-terminalen Ende des gesamten Carrier-Proteins (Valin $^{94'}$) reichte. Beide Peptide wurden simultan mit Dicyclohexylcarbodiimid an den festen Träger gekoppelt und konnten ohne Schwierigkeiten bis zur jeweils C-terminalen Aminosäure sequenziert werden.

Sequenz von T_c4:

```
41'                                  50'                 55'
LYS-GLY-ALA-ASP-ILE-MET-TYR-THR-GLY-THR-VAL-ASP-CYS-TRP-ARG
-----B6---------------→  ←-------------------B7--------------
```

Sequenz von T_c6:

```
 77'         80'
GLY-MET-GLY-GLY-ALA-PHE-VAL-LEU-VAL-LEU-TYR-ASP-GLU-
B7----→  ←-------------------------B8----------------
 90'             94'
ILE-LYS-LYS-PHE-VAL
------------------→
```

Mit der vollständigen Sequenzierung von T_c6 konnte eine 2 Aminosäuren lange Überlappung zwischen dem Bromcyanpeptid B7 und dem C-terminalen B8 des Carrier-Proteins erreicht werden (Vergleich mit Kap. 3.3).

T_c5 - T_c6 wurde zwischen unabgebautem A2 und dessen tryptischen N-terminalem Peptid T_c1 eluiert (Abb. 16). Dieses Peptid war durch unvollständige tryptische Spaltung am Argininrest 75' entstanden und erstreckte sich von Lysin $^{56'}$ bis zum C-Terminus des gesamten Proteins (Valin $^{94'}$). Die tryptischen Peptide,die durch Spaltung an Arginin $^{75'}$ entstanden waren, wurden, wie bereits in vorangegangenen Absätzen erwähnt, als Nebenkomponenten von T_c1 bzw. T_c4 identifiziert und teilweise auch sequenziert. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse des Fraktionsbereiches, der T_c5 - T_c6 als Hauptkomponente enthielt (Tab. 7) deutete durch den Threoningehalt (eine Aminosäure, die in dem tryptischen Peptid T_c5-T_c6 nicht enthalten ist) darauf hin, daß das tryptische Peptid T_c5 - T_c6 zu etwa 30-40% mit T_c4 kontaminiert war. Ein weiterer Hinweis auf diese Kontamination von T_c5 - T_c6 mit T_c4 war, daß bei der Umsetzung des Peptidgemisches mit Dansylchlorid nur das Lysin-Derivat identifizierbar war. (Arginin $^{40'}$ war, neben Arginin $^{55'}$, die einzige mögliche tryptische Spaltstelle bei citraconyliertem A2, die zu einem Peptid mit N-terminalem Lysin führen konnte). Die Schwierigkeiten, T_c5 - T_c6 neben T_c4 zu sequenzieren, konnten durch selektive Kopplung von T_c4 und T_c5 - T_c6 über die jeweiligen Lysinreste an 3-Aminopropyl-Glas gelöst wer-

den: Das als Nebenkomponente am Träger fixierte T_c4 wurde nach dem ersten Edman-Abbauschritt vollständig ausgewaschen, da in den folgenden 14 Positionen von T_c4 kein weiterer Lysinrest vorhanden war, der als zusätzlicher Befestigungspunkt am derivatisierten Glas dienen könnte. Die Hauptkomponente T_c5 - T_c6 konnte nach dem Auswaschen von T_c4 bis zum Lysinrest 91' abgebaut werden. Die Identifizierung des Lysinrestes in Position 91' zeigte, daß von den beiden aufeinanderfolgenden Lysinresten in Position 91' und 92' bevorzugt 92' als Ankerpunkt zur Immobilisierung des Peptids an dem festen Träger diente.

Sequenz von T_c5 - T_c6:

```
 56'              60'
LYS-ILE-ALA-LYS-ASP-GLU-GLY-PRO-LYS-ALA-PHE-PHE-LYS-GLY-
-------------------------------- B7 ---------------------
 70'                                      80'
ALA-TRP-SER-ASN-VAL-LEU-ARG-GLY-MET-GLY-GLY-ALA-PHE-VAL-
--------------------------------->  <--------------------
                             90'
LEU-VAL-LEU-TYR-ASP-GLU-ILE-LYS-LYS-(PHE, VAL)
-------- B8 ----------------------------------->
```

Die erfolgreiche Ermittlung der Aminosäurefolge der tryptischen Peptide T_c6 und T_c5 - T_c6 ermöglichte sowohl die Schließung der Lücke innerhalb des Bromcyanprptids B7 im Bereich des Tryptophanrestes 71' als auch die Verknüpfung von B7 mit dem Homoserin-freien C-terminalen Bromcyanpeptid B8. Die Aminosäuresequenz der C-terminalen Bereiche von T_c6 und T_c5 - T_c6 (-LYS-LYS-PHE-VAL) steht in vollständiger Übereinstimmung mit derjenigen des Carrier-Proteins (siehe Abschn. 3.2) und zeigte eindeutig, daß das acidolytische

Hauptfragment A2 den vollständigen C-terminalen Bereich des ADP/ATP-Carriers enthält (Abb. 16 auf Seite 66).

Abb. 16: Aminosäuresequenz des acidolytischen C-terminalen Peptids A2 des ADP/ATP-Carriers aus Rinderherz-mitochondrien.

Abkürzungen der Spaltpeptide:

B: Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins;

T_C: Tryptische Peptide von A2 nach Citraconylierung;

o-JBA: Peptide, die durch Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure an Tyrosin bzw. Tryptophanresten erhalten wurden;

T: Tryptische Peptide.

Bei Nachspaltungen wurde das Symbol der Erstspaltung dem der Zweitspaltung vorangestellt. Die Numerierung der Spaltpeptide erfolgte nachträglich entsprechend der Position in der Sequenz. Die C-terminale Sequenz des Carrier-Proteins wurde durch Inkubation mit Carboxypeptidase A und B (Cpase A+B) ermittelt.

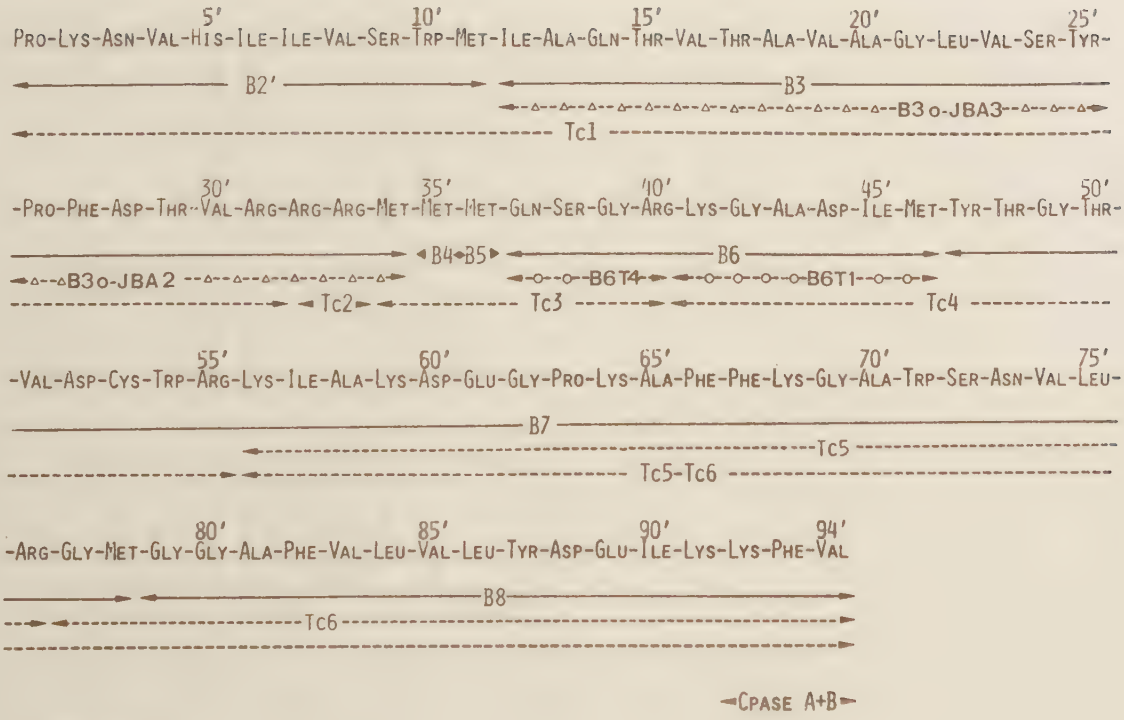

5' 10' 15' 20' 25'
Pro-Lys-Asn-Val-His-Ile-Ile-Val-Ser-Trp-Met-Ile-Ala-Gln-Thr-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gly-Leu-Val-Ser-Tyr-
B2'
B3
B3o-JBA3
Tc1
30' 35' 40' 45' 50'
-Pro-Phe-Asp-Thr-Val-Arg-Arg-Arg-Met-Met-Met-Gln-Ser-Gly-Arg-Lys-Gly-Ala-Asp-Ile-Met-Tyr-Thr-Gly-Thr-
B4
B5
B6
B3o-JBA2
B6T4
B6T1
Tc2
Tc3
Tc4
55' 60' 65' 70' 75'
-Val-Asp-Cys-Trp-Arg-Lys-Ile-Ala-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Lys-Ala-Phe-Phe-Lys-Gly-Ala-Trp-Ser-Asn-Val-Leu-
B7
Tc5
Tc5-Tc6
80' 85' 90' 94'
-Arg-Gly-Met-Gly-Gly-Ala-Phe-Val-Leu-Val-Leu-Tyr-Asp-Glu-Ile-Lys-Lys-Phe-Val
B8
Tc6
CPase A+B

Abb. 16

3.6 Vorversuche zur Charakterisierung des N-terminalen Bereichs des ADP/ATP-Carriers

Erste Hinweise, daß der N-Terminus des Carrier-Proteins blockiert war, stammten von einem mißglückten Versuch, das gesamte Polypeptid an einem Flüssigphasen-Sequenator abzubauen (Dr. Fietzek). Das Ergebnis der N-terminalen Analyse des Proteins mit Hilfe von Dansylchlorid deutete ebenfalls auf einen blockierten N-Terminus hin. Um auszuschließen, daß bei der sauren Trichloressigsäure-Fällung und den anschließenden Aceton-Wasser-Waschprozessen von Triton-CAT-Protein ein eventuell vorhandenes freies N-terminales Glutamin zu einem Pyroglutamat cyclisiert sein könnte, wurde folgendes Verfahren gewählt: Triton-CAT-Protein, gelöst im Isolierpuffer, wurde lyophilisiert, das nichtionische Detergens mit Methanol extrahiert und anschließend das Salz mit Wasser herausgewaschen. Das bei dieser Methode als Präzipitat anfallende Carrier-Protein wurde umgehend dansyliert - mit dem Ergebnis, daß keine dansylierte Aminosäure identifizierbar war.

Versuche, durch Inkubation des Carrier-Proteins in Methanol, 0,5 N HCl bei 20°C (71), Bedingungen, die im allgemeinen zur Deformylierung von Peptiden führen, einen freien N-Terminus zu erhalten, schlugen ebenfalls fehl. Drastischere Methoden, die zur Deacetylierung von Peptiden beschrieben sind (72), z.B. einstündiges Erhitzen in 0,5 N Salzsäure bei 100°C, führte zu einer totalen Zerstörung der Peptidkette - die

resultierenden Spaltpeptide waren selbst im Swank-Munkres-Gelelektrophoresesystem nicht mehr feststellbar.

Vorversuche, das Gesamtprotein sowohl in Suspension (nach Trichloressigsäurepräzipitation und Aceton/Wasser-Waschung) als auch gelöst in Triton-haltigem Isolierungspuffer mit Pyroglutamat-Aminopeptidase zu inkubieren, erbrachten keinen freien N-Terminus. Als Kontrollpeptid wurde Pyr-Ala verwendet, das in einem Parallelansatz ein eindeutiges dansyliertes Alanin ergab.

Eine Methode, um Informationen über den N-terminalen Bereich eines blockierten Polypeptids zu erhalten (73), ist die Inkubation mit einer Protease, die ein breites Wirkungsspektrum besitzt (z.B. Pronase, Elastase) oder der Abbau mit einem Gemisch proteolytischer Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidasen). Die erste Auftrennung erfolgt an einem stark sauren Kationenaustauscher (z.B. Dowex 50 -X8 in der H^+-Form) mit Wasser als Elutionsmedium. Saure Peptide, unter denen sich auch das N-terminal blockierte Peptid befindet, und nur teilweise gespaltenes Ausgangsmaterial, das nicht am Ionenaustauscher-Material adsorbiert wird, werden ausgewaschen. Amphotere und basische Peptide werden am Ionenaustauscherharz adsorbiert. Das wässrige Eluat wird dann auf eine Säule mit einem starken Anionenaustauscher (z.B. Dowex 1-X2) aufgetragen. Die großen Peptide, die auf dem Anionenaustauscherharz ebenfalls nicht adsorbiert wurden, werden mit Wasser eluiert. Die adsorbierten sauren Peptide, unter

denen sich auch das N-terminal blockierte Peptid befinden sollte, werden mit einem Salzsäuregradienten eluiert. Anschließend können die sauren Peptide noch entsprechend ihrem Molekulargewicht mit einer Molekularsieb-Säule fraktioniert werden. Die Detektion der Peptide erfolgt durch die Messung der Absorption des Eluats bei 220 nm.

Die Voraussetzung zur Anwendung dieser Technik zur Isolierung N-terminal blockierter Spaltpeptide ist, daß man möglichst kleine Bruchstücke erhält, um das Auswaschen des blockierten Peptids von der Anionenaustauscher-Säule zu vermeiden. Zum anderen neigen größere Peptide, besonders wenn sie hydrophober Natur sind, zu einer starken Wechselwirkung mit dem Ionenaustauscher-Material, mit dem Effekt, daß sie sich nur schwer oder auch gar nicht mehr eluieren lassen.

Zu Vorversuchen, das saure N-terminal blockierte Peptid des Carrier-Proteins zu erhalten, wurden folgende proteolytische Enzyme eingesetzt: Elastase, Pronase, Subtilisin und Thermolysin. Hydrolysiert wurden jeweils 10 mg Protein (entspricht 330 nMol). Bei der oben skizzierten Aufarbeitung eines Elastase-Hydrolyse-Ansatzes fielen N-terminal blockierte Peptide mit folgender Aminosäurezusammensetzung an: (Asp_2, Ser_2, Glu_2, Ala_2, Leu) (77 nmol), (Glu_2, Ala) (48 nmol) und Glu_2 (60 nmol). Ein Aliquot des Nonapeptids wurde mit Carboxypeptidase A inkubiert. Die zeitabhängige Freisetzung der Aminosäuren ermöglichte die Bestimmung der C-terminalen Sequenz dieses Peptids: -Ala-Leu-Ser. Aus einem Pronase-Abbau

ließ sich, neben einem Dipeptid Glu_2, ein in der Bruttozusammensetzung ähnliches N-terminal blockiertes Peptid isolieren: (Asp_2, Ser_2, Glu_2, Ala_2, Leu_2).

Vergleicht man die Aminosäurezusammensetzungen und den Inkubationsversuch mit Carboxypeptidase A der N-terminal blockierten Peptide, die bei der Inkubation des Carrier-Proteins mit Elastase und Pronase isoliert werden konnten, läßt sich unter der Einschränkung, daß das N-terminal blockierte saure Peptid des Carrier-Proteins nicht am Ionenaustauscher-Material festgehalten wurde und ein artifiziell cyclisiertes Peptid untersucht wurde, folgende N-terminale Sequenz für das Carrier-Protein erstellen: Glx-Glx-Ala-(Asp_2, Ser)-Ala-Leu-Ser-(Leu)-. Der Versuch, ein vermutetes Pyroglutamat des blockierten Nonopeptids mit Pyroglutamat-Aminopeptidase freizusetzen, mißlang.

3.7 Weitere Spaltversuche

Der auf die Spaltung an Argininresten beschränkte tryptische Abbau des citraconylierten Carrier-Proteins ergab eine große Anzahl von Spaltpeptiden ähnlichen Molekulargewichts. Der Versuch, einen tryptisch-citraconylierten Spaltansatz auf Polyacrylamidgelen (P-4,P-6,P-10; 200-400 mesh) in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8,0 aufzutrennen, ergab heterogene Assoziate (analysiert mit Hilfe der Dansyl-Endgruppenbestimmung, Gelelektrophorese nach Swank/Munkres, Dünnschichtchromatographie). Diese Assoziate ließen sich auch in

Gegenwart von SDS und/oder Harnstoff gelchromatographisch nicht mehr weiter fraktionieren. Der Einsatz von Ionenaustauscher-Säulen, die mit Pyridin-, Ammonium-, Formiat- und Acetat-Gradienten eluiert wurden, war unfruchtbar, da die Ausbeuten nach den jeweiligen Austauscher-Chromatographieschritten sehr niedrig waren (weniger als 5%). Bei der Auftrennung tryptisch citraconylierter Spaltpeptide des Carrier-Proteins an Bio-Gel P-30-Säulen in 80% Ameisensäure zeigte sich, daß die ausschließliche Fraktionierung dieser Peptide mit Gelchromatographie wegen der ähnlichen Molekulargewichte der entstandenen Bruchstücke unmöglich war.

Vorversuche, um Überlappungspeptide aus dem gesamten Carrier-Protein zu erhalten, wurden mit Staphylococcus aureus Protease V8 (74, 75) in folgenden Puffern unternommen: als Suspension in 200 mM Ammoniumacetat bei pH 4 oder gelöst in 0,1% SDS, 100 mM TRIS, pH 8,0 oder gelöst in Triton X-100 haltigem Isolierungspuffer. Die gelelektrophoretische Analyse der Spaltansätze ergab nur ungespaltenes Ausgangspeptid, obwohl in der Primärstruktur des acidolytischen Bruchstücks A2 eine ausreichende Anzahl potentiell spaltbarer Glu-X und Asp-X-Bindungen vorhanden waren. Bei der Inkubation des Proteins mit Staphylococcus protease, das in 4 M Harnstoff, 200 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,8 suspendiert worden war, entstanden zu etwa 20% zwei Fragmente im Molekulargewichtsbereich von 13 000 bis 18 000.

Spaltversuche mit Hydroxylamin, um Asn-Gly oder Asp-Pro-Bindungen des Carrier-Proteins zu spalten, mißlangen sowohl in Suspension (2 M NH_2OH, 0,2 M K_2CO_3) (76) als auch in Lösung (6 M GuaHCl, 2 M NH_2OH, 4,5 M LiOH, pH 9,0) (77). Da sich im C-terminalen Bereich des Proteins keine mit Hydroxylamin spaltbare Bindung befand, war es nicht überraschend, daß ein Spaltversuch am acidolytischen Fragment A2 ebenfalls negativ verlief.

Versuche, sowohl das Protein als auch das N-terminal blockierte Bromcyanpeptid B1 mit Heptafluorbuttersäure/Ameisensäure/Bromcyan an den Tryptophanresten zu spalten (78), lieferten nur unverändertes Ausgangsmaterial. Die Spaltmethode nach Savige und Fontana (79) an Tryptophanresten mit Dimethylsulfoxid und Bromwasserstoffsäure ergab sowohl beim Carrier-Protein als auch bei den großen Fragmenten B1 und A2 zu etwa 20-30% Spaltpeptide, die nach der Auftrennung an einer Bio-Gel P-30-Säule in 80% Ameisensäure blockierte N-Termini aufwiesen.

Bei der Behandlung des acidolytischen Fragments A2 mit o-Iodosobenzoesäure in 80% Ameisensäure, einem Verfahren, bei dem sowohl Trp-X (62) als auch Tyr-X-Bindungen (63) gespalten werden, entstanden in einer Spalt- und Trennausbeute von etwa 20% Fragmente, die aufgrund ähnlicher Größe (zweimal 7, einmal 10, 15, 16, 17, 21 Aminosäurereste lang) gelchromatographisch nicht mehr weiter aufgetrennt werden konnten (Bio-Gel P-30 in 80% Amei-

sensäure). Versuche, diese Peptide auf Bio-Gel-Säulen (P-4, P-10) in 10% Ameisensäure nachzureinigen, mißlangen, da sich die Peptide mit 10% Ameisensäure nicht mehr eluieren ließen.

Diskussion

1 Löslichkeits- und Trennprobleme

Bei den Sequenzierungsarbeiten am ADP/ATP-Carrier ergaben sich einige technische Schwierigkeiten, wie die asymmetrische Verteilung der Methioninreste innerhalb der Polypeptidkette oder die Trennprobleme hydrophober Spaltpeptide. Ergebnis der Bromcyanspaltung war ein großes Fragment B1 (M_r= 22 000) mit dem blockierten N-Terminus des Ausgangsmaterials. Deshalb konnten zunächst nur die kleineren Peptide B2' bis B8, die aus dem C-terminalen Bereich des Proteins stammten, sequenziert werden.

Neben der Bromcyanspaltung war die Hydrolyse des Carrier-Proteins in Ameisensäure von großer Bedeutung: Sie ergab, neben einem ähnlich großen, N-terminal blockierten Peptid A1 (M_r= 23 000), ein C-terminales Fragment A2 (M_r= 10 000), das sowohl als Ganzes als auch in Form seiner tryptischen Peptide die Basis für die Anordnung der kleineren Bromcyanpeptide B2' bis B8 bildete.

Das Ergebnis der Methansulfonsäurekinetik des Carrier-Proteins (Tab. 1) ergab für Methionin keinen eindeutigen Wert. Als höchster Meßwert wurden bei der 24-stündigen Hydrolyse 5,7 Methionine pro Monomer gefunden (deshalb der extrapolierte Wert 6-7). Addiert man die Anzahl der Homoserinreste der Bromcyanpeptide B1 bis B8, kommt man auf sieben Methionine. Wenn dagegen sowohl B2 als auch B2' acidolytische Fragmente von B1 sein sollten, würde das Protein sechs Methioninreste enthalten. Die Konsequenz aus der zweiten Möglichkeit wäre, daß die ersten elf Aminosäuren des acidolytischen Peptids A2 (von Prolin $^{1'}$ bis Methionin $^{11'}$) den Überlappungsbereich darstellen zwischen dem großen, N-terminal blockierten Bromcyanpeptid B1 und den kleineren Bromcyanpeptiden. Diese Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt werden, da die Inkubation von B1 mit Carboxypeptidase A und B ergebnislos verlief.

Die Löslichkeitsprobleme, sowohl des gesamten Proteins als auch der resultierenden Spaltpeptide, konnten durch die Verwendung von 80% Ameisensäure und des Gemisches Ethanol/Ameisensäure als Solventien gemeistert werden. Das aus SDS-haltigem Puffer durch Trichloressigsäurefällung präzipitierte denaturierte Carrier-Protein beispielsweise war in 8 M Harnstoff unlöslich. Erst durch Zusatz von 1% SDS (w/v) gelang es, das Protein in Lösung zu bekommen. Aus demselben Grund mußte die Ameisensäurekonzentration bei der Bromcyanspaltung von 70% (60) auf 80% erhöht werden. Löste man das Protein in reiner Ameisensäure und verdünnte mit Wasser auf 70%,

fiel das Protein bereits aus, während es bei 80% noch vollständig in Lösung war. Bei der tryptischen Nachspaltung des säuregespaltenen Peptids A2 ging das citraconylierte Peptid, das vor der Protease-Zugabe in dem Ammoniumhydrogencarbonatpuffer als Suspension vorlag, nach der Trypsin-Inkubation rasch in Lösung.

Obwohl einzelne Bromcyanpeptide (B2, B2', B3, B4, B5, B6) bereits in 10% Ameisensäure löslich waren (Aufnahme in konzentrierter Säure und sukzessiver Verdünnung mit Wasser), war es absolut notwendig, sowohl die Bromcyanpeptide,als auch die tryptisch nachgespaltenen Peptide entweder an Bio-Gel P-30 in 80% Ameisensäure oder an Sephadex LH 60 in dem Ameisensäure/Ethanol-Gemisch (69) zu rechromatographieren. Versuche, die Peptide in verdünnten Carbonsäuren (10-30% Ameisensäure bzw. Essigsäure) auf Polyacrylamid-Gelen unterschiedlicher Porenweite nachzureinigen, führten zur Adsorption der Peptide durch die Gelmatrix. Die Verwendung von Bio-Gel P-30 und des modifizierten Dextrangels LH 60 in hohen Konzentrationen von Ameisensäure ermöglichte die Anreicherung der meisten Peptide bis zu einem Grad, der ausreichend zur Sequenzbestimmung war.

4.2 Membranproteine mit bekannter Primärstruktur

Primärstrukturen vergleichbarer Membranproteine sind erst in wenigen Fällen bekannt, beispielsweise des Bakteriorhodopsins aus Halobakterium halobium (80), der Proteolipide aus den

ATPase-Komplexen unterschiedlicher Organismen (81, 82), des Glycophorins (83), des Phagen M13 Hüllproteins (84), des Cytochrom b5 (85), der Untereinheit II der Cytochrom-Oxidase (86), der Proteine I und II der äußeren Escherichia coli B/r Membran (87, 88) und der Ca-ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (89-94). Die ersten beiden Proteine, das Bakteriorhodopsin und die Proteolipide, sind fast vollständig in der jeweiligen Lipid-Doppelschicht eingebettet, während die anderen erwähnten Proteine nur teilweise in der Membran verankert sind und mehr oder weniger weit in den umgebenden Raum hineinreichen. Lediglich für Bakteriorhodopsin ist bis jetzt die Tertiärstruktur verfügbar: Das Protein erstreckt sich in sieben fast parallel angeordneten Helices, die sich senkrecht zur Membranoberfläche erstrecken (95, 96). Einige "Umkehrschleifen" befinden sich außerhalb der Purpur-Membranoberfläche und sind somit proteasezugängig (97, 98).

Vom Lactose-Permease-Protein aus E-coli ist proteinchemisch erst der 10 Aminosäuren umfassende N-terminale Bereich bekannt (99). Die Primärstruktur dieses Transportproteins wurde durch die DNA-Sequenzierung des lac Y-Gens vorhergesagt (100).

Es bestehen aber noch erhebliche Diskrepanzen über das Molekulargewicht dieses Proteins. Aus der DNA-Sequenz läßt sich ein 417 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 46 500 ableiten (100), dessen N-terminale Sequenz mit der proteinchemischen Sequenzanalyse überein-

stimmt (99). Dieses aus der DNA-Sequenz abgeleitete Molekulargewicht ist aber beträchtlich höher als mit SDS-Gelelektrophorese ermittelte Werte von 29 000 (101) und 30 000 (102). Die Autoren (100) vermuten, daß sich entweder das Lactose-Permease-Protein bei der SDS-Gelelektrophorese atypisch verhält, oder daß es beim Einbau in die Membran proteolytisch am C-Terminus gespalten wird.

4.3 Strukturelle Eigenschaften des C-terminalen Peptids A2

Das durch die Säurespaltung des Proteins gewonnene Hauptfragment A2 mit einem Molekulargewicht von etwa 10 000 beginnt mit einem N-terminalen Prolin, wahrscheinlich durch Hydrolyse einer säurelabilen Asx-Pro-Bindung (61).

Eine ähnlich labile Asp-Pro-Verknüpfung trat bei Sequenzierarbeiten von Cytochrom b aus Rinderherzmitochondrien auf (103). Analog zum ADP/ATP-Carrier konnte bei Cytochrom b nach Immobilisierung an den festen Trägern durch Ameisensäureinkubation das C-terminale Drittel des Proteins abgespalten und partiell sequenziert werden.

Auch hier traten, ähnlich wie beim Lactose-Permease-Protein (99, 100), Diskrepanzen bei der Bestimmung des Molekulargewichts von Cytochrom b auf: Während, entsprechend der DNA-Sequenz von Cytochrom b (104) ein M_r= 42 000 zu erwarten wäre, erhält man bei der Spaltung des bc_1-Komplexes ein isoliertes Cytochrom b mit M_r= 30 000 (SDS-Gelelektrophorese) (105).

Die Sequenz von A2 enthält 6 Methioninreste und ermöglichte auf diese Weise die kleineren Bromcyanpeptide des Carrier-Proteins aneinander zu reihen. A2 hat nach dem von Capaldi und Vanderkooi beschriebenen Verfahren (106) dieselbe Polarität (0,38) wie das ungespaltene Protein. Das weist darauf hin, daß keine bevorzugte Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren entlang der Polypeptidkette stattfindet. Betrachtet man die Sequenz des acidolytischen Fragments A2 (Abb. 16), erkennt man, daß sich die längste unpolare Sequenz, die auf beiden Seiten von geladenen Aminosäureresten begrenzt wird, von Isoleucin $^{6'}$ bis Phenylalanin $^{27'}$ erstreckt. Dieser Bereich schließt lediglich 5 Hydroxyaminosäuren und einen Glutaminrest mit ein, die zwar als polare Aminosäuren zu betrachten sind, aber keine Nettoladung tragen. Diese Sequenz von 22 aufeinander folgenden ungeladenen Aminosäureresten wäre in der Lage, die Membran zu durchdringen.

Ein weiterer unpolarer Abschnitt, der nur von einem Lysin- und einem Argininrest unterbrochen wird, umfaßt den Bereich von Alanin $^{64'}$ bis Tyrosin $^{86'}$.

Auffallend ist das gehäufte Auftreten geladener Aminosäuren: Neben der Aufeinanderfolge dreier benachbarter Argininreste in Position 31' bis 33' existieren zwei weitere Arg-Lys-Bindungen in Position 40' und 55'. Ein ähnliches Verhalten zeigen die sauren Aminosäurereste: Es sind 2 Asp-Glu-Bindungen in Position 60' und 88' vorhanden, die sich in enger Nachbarschaft zu basischen Aminosäureresten befinden (Lysin $^{59'}$, $^{63'}$

und Lysin $^{91'}$ sowie Lysin $^{92'}$).

4.4 Einige Aspekte der Festphasensequenziertechnik

Mit der Verwendung des Festphasen-Sequenators konnte ein weiterer Anreicherungseffekt erzielt werden: Bromcyanpeptide wurden selektiv über ihre C-terminalen Homoserinreste an den festen Träger gekoppelt und während des Waschschrittes von nicht am derivatisierten Glas immobilisierten hydrolytischen Spaltprodukten befreit.

Ein weiteres, eher zufälliges Anwendungsbeispiel für die Reinigungsmöglichkeiten bei selektiven Ankopplungsverfahren dieser Festphasentechnik wurde bei dem simultanen Edman-Abbau des Peptid-Gemisches T_C5 - T_C6 und T_C4 angewandt (siehe Abschnitt 3.5). Diese beiden Peptide konnten mit den beschriebenen gelchromatographischen Methoden nicht aufgetrennt werden, da sie an der Bio-Gel P-30-Säule zusammen eluiert wurden und bei der Gelelektrophorese eine Bande zeigten. Sie besitzen beide Lysin als N-terminalen Aminosäurerest und waren so ununterscheidbar.

4.5 Photoaffinitätsmarkierung des ADP/ATP-Carriers

Kürzlich haben Boulay et al. (107) die Photoaffinitätsmarkierung des Adeninnucleotid-Carriers an Rinderherzmitochondrien mit ^{3}H-Arylazido-Atractylosid beschrieben. Die Bromcyanspaltung des isolierten Proteins ergab, daß die

radioaktive Markierung im großen, N-terminal blockierten Peptid B1 mit einem Molekulargewicht von etwa 23 000 erfolgte. Obwohl die von diesen Autoren ermittelte Aminosäurezusammensetzung sowohl des ungespaltenen Proteins als auch von B1 ähnlich sind, existieren doch erhebliche Unterschiede bei einzelnen Aminosäureresten. Abweichungen $> \pm 1$ in der Aminosäurezusammensetzung von B1 sind bei folgenden Resten anzutreffen: Serin, Glutaminsäure bzw. Glutamin, Glycin, Alanin, Valin, Phenylalanin, Lysin und Arginin.

Möglicherweise haben diese Autoren, da sie nach der Solubilisierung des Carrier-Proteins mit Triton X-100 nur die Hydroxylapatit-Adsorptions-Chromatographie als einzigen Reinigungsschritt verwandt haben, mit einem nur unzureichend homogenen Ausgangsmaterial gearbeitet.

4.6 Homologievergleiche mit anderen Membranproteinen

Vergleicht man die Primärstruktur der C-terminalen Region des Carrier-Proteins mit anderen adeninnucleotidbindenden Dehydrogenasen, ist es nicht möglich, einfache Homologien festzustellen. Einige kurze Homologien konnten durch Vergleich mit einigen bereits bekannten Primärstrukturen von Membranproteinen gefunden werden: Untereinheit II der Cytochrom Oxidase (Leu $^{84'}$-Val-Leu-Tyr) (86), Phagen M13 Hüllprotein (Lys $^{81'}$-Lys-Phe) (84), Cytochrom b_5 (Lys $^{56'}$-Ile-Ala-Lys) (85) und Bakteriorhodopsin (Lys $^{91'}$-Lys-Phe; Asp $^{60'}$-Glu-Gly) (80).

4.7 Ausblick

Nach Abschluß der Arbeiten an der Primärstruktur des ADP/ATP-Carrier-Proteins kann man daran gehen, mit nucleotid-analogen Photoaffinitätsreagentien (z.B. N-4-Azido-2-Nitrophenylaminobutyryl-ADP (108)) die aktive Stelle des Translokators zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit, den Nucleotidbindungsbereich des Translokators im cytoplasmischen Kompartiment zu bestimmen, wäre die bereits in Kapitel 4.5 erwähnte Markierung des Proteins in der Mitochondrienmembran mit dem Transport-Inhibitor 4-Azido-2-Nitrophenylaminobutyryl-Atractylat (109).

5. Anhang

5.1 Die Chou-Fasman Methode zur Vorhersage der Proteinsekundärstruktur

Mit der Sequenz des C-terminalen acidolytischen Peptids A2 des ADP/ATP-Carriers, die in Abb. 16 dargestellt ist, wurde mit Hilfe der Chou-Fasman-Methode (110) versucht, die Sekundärstruktur dieses Bereichs vorherzusagen. Diese Methode wurde ausgewählt, weil sich die veröffentlichten Daten zur Vorhersage der α-Helices, der ß-Faltblattstrukturen und der ß-Turns mühelos mit einem Taschenrechner verarbeiten lassen.

Die Autoren untersuchten, wie häufig die einzelnen Aminosäuren in den erwähnten drei Konformationen bei 29 globulären Proteinen auftraten, deren Primär- und Sekundärstruktur bereits bekannt war. Dividiert man die Häufigkeit, mit der die einzelnen Aminosäuren in den drei Konformationen auftreten, durch die Häufigkeit, mit der diese drei Zustände in den 29 untersuchten Proteinen vorkommen, erhält man die normierten "Proteinkonformationsparameter" P_α, P_β (Tab. 8) und P_t.

	P_α	Helikale Zuordnung		P_β	Faltblatt-Zuordnung
Glu^-	1.51	H_α	Val	1.70	H_β
Met	1.45	H_α	Ile	1.60	H_β
Ala	1.42	H_α	Tyr	1.47	H_β
Leu_+	1.21	H_α	Phe	1.38	h_β
Lys^+	1.16	h_α	Trp	1.37	h_β
Phe	1.13	h_α	Leu	1.30	h_β
Gln	1.11	h_α	Cys	1.19	h_β
Trp	1.08	h_α	Thr	1.19	h_β
Ile	1.08	h_α	Gln	1.10	h_β
Val	1.06	h_α	Met_+	1.05	h_β
Asp^-_+	1.01	I_α	Arg^+	0.93	i_β
His^+	1.00	I_α	Asn_+	0.89	i_β
Arg^+	0.98	i_α	His^+	0.87	i_β
Thr	0.83	i_α	Ala	0.83	i_β
Ser	0.77	i_α	Ser	0.75	b_β
Cys	0.70	i_α	Gly_+	0.75	b_β
Tyr	0.69	b_α	Lys^+	0.74	b_β
Asn	0.67	b_α	Pro	0.55	B_β
Pro	0.57	B_α	Asp^-	0.54	B_β
Gly	0.57	B_α	Glu^-	0.37	B_β

Tabelle 8: Konformationsparameter der Aminosäuren in α-helikaler und ß-Faltblattkonformation (aus (110)).

Helikale Zuordnung: H_α: starke Helixbildner; h_α: Helixbildner; I_α: schwache Helixbildner; i_α: Helixindifferent; b_α: Helixbrecher; B_α: starke Helixbrecher. Faltblattzuordnung: H_β, h_β: starke bzw. normale Faltblattbildner; i_β: indifferent; b_β, B_β: normale bzw. starke Faltblattbrecher.

Bemerkenswert ist, daß alle 5 geladenen Aminosäurereste Faltblattkonformationsparameter P_β kleiner als 1 zeigen, ein Hinweis darauf, daß sie zur Bildung dieser Konformation ungünstig sind. Andererseits haben 3 der 5 geladenen Aminosäuren (Asparginsäure, Histidin, Arginin) P_α-Werte in der Gegend von 1, während Glutaminsäure und Lysin mit $P_\alpha > 1$ zur Klasse der helixbildenden Aminosäuren gehören.

Die P_α- und P_β-Konformationsparameter geben das relative Potential an, mit der die einzelnen Aminosäuren in diesen beiden Konformationsarten vorkommen. Diese Werte ermöglichen keine Aussage darüber, daß diese Aminosäuren bevorzugt in bestimmten Positionen der jeweiligen Strukturelemente auftreten. Diese Informationen erhält man, wenigstens teilweise, durch die "Konformationsgrenzanalyse", um zu entscheiden, welche Aminosäurereste bevorzugt am Amino- und Carboxylende von helikalen und Faltblattstrukturen vorkommen.

Diese Analyse berücksichtigt die Häufigkeit, mit der die jeweiligen Aminosäuren die 3 Positionen am Anfang und Ende der beiden Konformationsarten besitzen, einschließlich der unmittelbar darauf folgenden N- und C-terminalen 3 Positionen. Durch Division mit der Durchschnittshäufigkeit, mit der die 3 "Grenzwertpositionen" in den untersuchten 29 Proteinen auftreten, erhält man die normierten Konformationsparameter für die Helix- und Faltblatt-Begrenzungsaminosäuren: $P_{\alpha N}$ und $P_{\alpha C}$ für die drei Aminosäuren an den beiden helikalen Enden und $P_{n\alpha N}$ bzw. $P_{n\alpha C}$ für die drei unmittelbar anknüpfen-

den nicht helikalen drei Aminosäuren Entsprechende Daten erhält man für die ß-Faltblatt-Konformation. Normalisierte Werte größer als 1 weisen darauf hin, daß diese Aminosäuren in den jeweiligen Grenzpositionen bevorzugt auftreten.

Die negativ geladenen Aminosäurereste Asparginsäure und Glutaminsäure (mit $P_{\alpha N}$-Werten von 2.44 und 2.02) zeigen eine deutliche Präferenz am N-terminalen helikalen Ende, während die positiv geladenen Reste Lysin, Histidin und Arginin (mit $P_{\alpha C}$ 1.83, 1.77 und 1.25) häufig am C-terminalen helikalen Ende zu finden sind. Prolin erscheint N-terminal doppelt so häufig als es dem Durchschnittswert entsprechen würde - C-terminal tritt es überhaupt nicht auf ($P_{\alpha N}$ = 2.01 : $P_{\alpha C}$ = 0).

Während die geladenen Aminosäuren hohe Präferenzen an helikalen Grenzen aufweisen, ist eine ähnliche Bevorzugung an Faltblattgrenzen nicht zu beobachten. Mit Ausnahme des Lysins (mit $P_{\alpha N}$: 1.0), das in der Faltblattkonformation bevorzugt N-terminal auftritt, zeigen alle anderen geladenen Aminosäuren $P_{\beta N}$- und $P_{\beta C}$-Werte kleiner als 1, wobei Histidin, Glutaminsäure und Asparginsäure die kleinsten vorkommenden $P_{\beta N}$-Werte haben (0.54 - 0.35).

Die Röntgenstruktur-Daten der 29 untersuchten Proteine zeigten 408 ß-turns in Bereichen der Kettenumkehr. Die Häufigkeit, mit der die einzelnen Aminosäuren in der ersten, zweiten, dritten und vierten Position eines ß-turns vorkommen, erhält man, wenn man die Anzahl der jeweiligen Aminosäuren

in den ß-turn Positionen 1, 2, 3 und 4 durch die Gesamtanzahl der jeweiligen Aminosäuren in den 408 ß-turns dividiert.

Ordnet man die Häufigkeit, mit der die Aminosäuren in den ß-turn Positionen 1 bis 4 auftreten, hierarchisch an, stellt man fest, daß folgende Reste gehäuft in Position 1 vorkommen: Aspargin (16%), Cystein (15%), Asparginsäure (15%); in Position 2: Prolin (30%), Serin (14%), Lysin (12%); in Position 3: Aspargin (19%), Glycin (19%), Asparginsäure (18%); in Position 4: Tryptophan (17%), Glycin (15%) und Cystein (13%).

Bei einigen Aminosäureresten findet man eine ausgeprägte Bevorzugung bestimmter Positionen innerhalb eines ß-turns: Prolin in zweiter (30%), aber nicht in dritter (3%) Position; Tryptophan in der vierten (17%), aber nicht in der zweiten (1%) Position; Histidin in der ersten (14%), aber nicht in der zweiten (5%) oder dritten (5%) Position; Cystein in der ersten (15%), aber nicht in der zweiten (5%) Position; Lysin in der zweiten (13%), aber nicht in der ersten (6%) Position und Glutamin in der vierten (10%), aber nicht in der dritten (4%) Position.

Aminosäurereste mit dem höchsten ß-turn Potential in allen 4 Positionen (P_t-Werte) sind Aspargin (1.56), Glycin (1.56), Prolin (1.52), Asparginsäure (1.46) und Serin (1.42). Die hydrophoben Aminosäuren zeigen die niedrigsten P_t-Werte (0.66 - 0.47).

5.2 Regeln zum Auffinden helikaler Bereiche

Man klassifiziert alle Aminosäurereste innerhalb der Sequenz mit den entsprechenden Konformationszuordnungsparametern H_α bis B_α und H_β bis B_β, wobei die Symbole H und h als starke und mittlere Wasserstoffbrücken-bildende Aminosäuren innerhalb einer α-Helix oder eines ß-Faltblattes angesehen werden mögen. Voraussetzung zur Bildung einer Helix ist, daß man in einer Sequenz von 6 Aminosäuren 4 helixbildende antrifft (H_α oder h_α), wobei schwach helixbildende Aminosäuren halb zählen ($I_\alpha = 1/2\ h_\alpha$). Die Helix kann in beiden Richtungen verlängert werden, bis ein "helixbrechendes Tetrapeptid" erreicht wird. Die aus 6 Aminosäuren bestehende "Urhelix" sollte mindestens aus zwei Drittel Aminosäuren der Klassifizierung H oder h bestehen, während die verlängerte Helix mindestens zur Hälfte aus helixbildenden Aminosäuren aufgebaut sein sollte. Sowohl der "Urhelix"-Bereich als auch die verlängerte Helix sollten aus weniger als ein Drittel helix-brechenden Aminosäuren bestehen (b_α oder B_α).

Die verlängerte Helix wird an beiden Enden durch folgende "Tetrapeptidbrecher" mit $\langle P_\alpha \rangle < 1.00$ begrenzt: b_4, b_3i, b_3h, b_2i_2, b_2ih, b_2h_2, bi_3, bi_2h, bih_2 und i_4. Einige Tetrapeptide wie hi_3, h_2i_2, ermöglichen trotz $\langle P_\alpha \rangle < 1.00$ eine Verlängerung der Helix. Nachdem eine Helix definiert ist, können einige Reste (h oder i) eines "Tetrapeptidbrechers" in eine Helix integriert werden. Beispielsweise kann aus dem "helixbrechenden" Tetrapeptid bbhi der Teil (hi) nur N-terminal in eine Helix eingebaut werden - bb kann weder N- noch

C-terminal zum Helixaufbau verwendet werden. Benachbarte ß-Bereiche, die ein höheres ß als ∝-Potential haben (d.h. $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$, können eine Helixverlängerung auch abbrechen).

Prolin kann nicht in das Innere oder am C-terminalen Ende einer Helix eingebaut werden. Möglich ist die Verwendung von Prolin innerhalb der ersten Umdrehung (d.h. der ersten drei Aminosäuren) im N-terminalen Bereich einer Helix.

Regel 1: Jeder mindestens 6 Aminosäurereste lange Abschnitt eines Proteins mit $\langle P_\alpha \rangle \geq 1.03$ und $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$, der die oben genannten Bedingungen erfüllt, wird als helikal vorhergesagt.

5.3 Regeln zum Auffinden von Faltblattbereichen

Zur Kernbildung eines ß-Faltblatts sind bereits drei zusammenhängende ß-Bildner (H_β oder h_β) ausreichend oder wenn sich innerhalb einer 4 oder 5 Aminosäurereste langen Sequenz mindestens 3 ß-Bildner (H_β oder h_β) befinden.

Für die beidseitige Verlängerung eines einmal definierten ß-Faltblattes und für das Ende der Verlängerung treffen dieselben Regelungen zu wie im Falle einer ∝-Helix.

Geladene Aminosäuren und Prolin sind die stärksten "ß-Faltblattbrecher" und werden nicht in ß-Faltblattstrukturen ein-

gebaut, außer sie treten in Tetrapeptiden auf mit $\langle P_\alpha \rangle < \langle P_\beta \rangle > 1$.

Regel 2: Jeder mindestens 3 Aminosäuren lange Abschnitt eines Proteins mit $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05 > \langle P_\alpha \rangle$, der die genannten Bedingungen erfüllt, wird als ß-Faltblatt vorhergesagt.

5.4 Überlappende α- und ß-Bereiche

Allgemein gilt die Regelung, daß ein Bereich als α-helikal vorhergesagt werden kann, wenn $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$. Das gleiche gilt für die Vorhersage eines ß-Faltblatts, wenn $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$. Eine weitere Hilfe, wenn Bereiche innerhalb einer Sequenz sowohl α- als auch ß-Potential besitzen, stellen die Helix- und Faltblattgrenzwertparameter dar, um entscheiden zu können, ob innerhalb eines bestimmten Sequenzbereiches eine Konformation bevorzugt wird.

Da α-Helices im allgemeinen länger sind als ß-Faltblätter, wird ein längerer Abschnitt, der sowohl α- als auch ß-Potential hat, als helikal vorausgesagt, wenn $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$. Diese Regelung gilt sogar, wenn innerhalb einer längeren Helix ein kürzerer Bereich (von etwa 5 Aminosäuren) auftritt, der in diesem kurzen Abschnitt ein höheres ß-Potential besitzt.

Bereiche, die zu beiden Seiten eines ß-turns sowohl α- als auch ß-Potential haben, werden als ß-Faltblatt vorhergesagt,

wenn zu beiden Seiten des vorhergesagten ß-turns mindestens drei faltblattbildende Aminosäuren (H_β oder h_β) stehen.

Regel 3: Jeder Abschnitt mit überlappenden α- und ß-Bereichen wird mit Hilfe der Konformations-Grenzanalyse untersucht; er wird als α- Helix vorhergesagt, wenn $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$ und als ß-Faltblatt, wenn $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$. Faltblattbildende Aminosäuren werden in eine Helix eingebaut, wenn sie nicht in einem helixbrechenden Tetrapeptid vorkommen.

5.5 Regeln zum Auffinden der ß-turns

Zwei Methoden ermöglichen die Vorhersage von ß-turns: Einmal die Ermittlung des durchschnittlichen ß-turn-Potentials eines Tetrapeptids, das von Aminosäurerest (i) bis (i+3) reicht. Wahrscheinlich ist ein ß-turn, wenn das ß-turn-Potential größer ist als das α- und das ß-Potential (d.h. wenn $1 < \langle P_t \rangle > \langle P_\alpha \rangle, \langle P_\beta \rangle$).

Die zweite Möglichkeit zur Vorhersage eines ß-turns ist die Ermittlung der Wahrscheinlichkeit, mit der ein ß-turn in Position (i) auftritt. Sie basiert auf dem Produkt der Einzelhäufigkeiten, mit der die einzelnen Aminosäurereste in den jeweiligen Positionen des Tetrapeptids auftreten. Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit, mit der ein ß-turn auftritt, beträgt $\langle P_t \rangle = 0.55 \times 10^{-4}$. Tetrapeptide mit einem

P_t-Wert von 1.0×10^{-4} (d.h. dem doppelten Durchschnittswert) weisen darauf hin, daß es sich bei dem betreffenden Tetrapeptid um einen ß-turn handelt.

5.6 Die Vorhersage der Sekundärstruktur des acidolytischen Fragments A2 des ADP/ATP-Carriers

Die Aminosäuresequenz des 94 Reste langen acidolytischen Fragmentes A2 ist in der Abb. 17A in der "Ein-Buchstaben-Schreibweise" dargestellt. Darunter, in Abb. 17B, folgt die schematische Aufzeichnung der Verteilung der geladenen und der hydrophoben Aminosäuren: große, in Plus-Richtung gezeichnete senkrechte Striche geben die Positionen der basischen Aminosäurereste Arginin, Lysin und Histidin; in Minus-Richtung gezeichnete senkrechte Striche geben die Positionen der sauren Aminosäurereste Glutaminsäure und Asparginsäure an. Die kleinen Striche entlang der Null-Linie symbolisieren die Lage der hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Sequenz von A2.

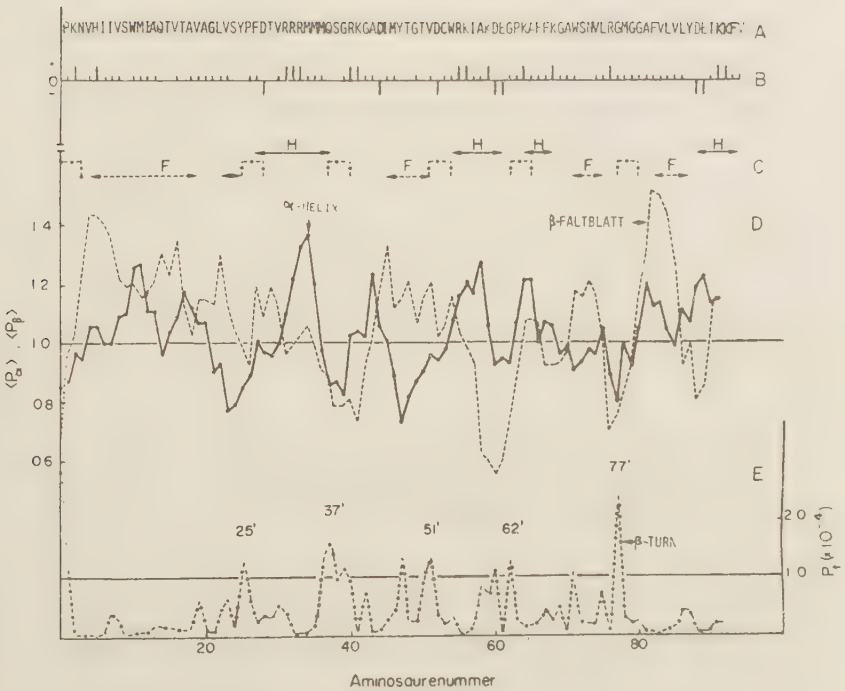


Abb. 17: Vorhergesagtes Konformationsprofil des C-terminalen Peptids A2 des Adeninnucleotid-Carriers.

(A) Primärstruktur von A2 in der "Ein-Buchstaben-Schreibweise".
(B) Verteilung der sauren, basischen und hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Sequenz. Lange Striche in Plusrichtung geben die Positionen von Arginin, Lysin oder Histidin an, lange Striche in Minusrichtung die von Asparginsäure oder Glutaminsäure, kleine Striche entlang der Null-Linie die von hydrophoben Aminosäuren.
(C) Die mit den Chou-Fasman-Regeln vorhersagbaren α-helikalen ($\overset{H}{\longleftrightarrow}$), ß-Faltblatt- ($\overset{F}{\longleftrightarrow}$) und ß-turn-Bereiche ($\cdot\overset{T}{-}\cdot$).
(D) Das mittlere α-helikale (——) und ß-Faltblatt-Potential (---) von Tetrapeptiden, die von Position (i) bis (i+3) reichen, basierend auf den Konformationsparametern P_α und P_β der einzelnen Aminosäuren.
(E) Das ß-turn Wahrscheinlichkeitsprofil von Tetrapeptiden P_t (-.-), das durch Produktbildung der Häufigkeiten der 4 Aminosäuren in Position (I) bis (i+3) ermittelt wurde. Die horizontale Linie bei P_t=1.0 gibt den zweifachen durchschnittlichen Wert an, mit der ß-turns auftreten.

Die Konformationszuordnung der α - und ß-Bereiche des C-terminalen acidolytischen Peptids A2, wie sie mit Hilfe der Konformationsparameter für α-Helices und ß-Faltblattstrukturen und der jeweiligen Grenzwertparameter erstellt werden konnte, ist graphisch in Abb. 17C dargestellt. Zusätzlich sind in Tabelle 9 die durchschnittlichen Helix- und Faltblattpotentiale $\langle P_\alpha \rangle$ und $\langle P_\beta \rangle$ der vorhergesagten Konformationsbereiche aufgeführt. In den letzten beiden Spalten von Tabelle 9 sind die Symbole der N- und C-terminalen "Tetrapeptidbrecher" aufgenommen.

In Abbildung 17D ist das durchschnittliche helikale und Faltblatt-Potential von Tetrapeptiden aufgezeichnet, die von Position (i) bis (i+3) reichen.

Das ß-turn Wahrscheinlichkeitsprofil mit Maxima bei Position 25', 37', 51', 62' und 77' von A2 in Abbildung 17E zeigt die Punkte der Kettenumkehr an. Die horizontale Linie bei $P_t = 1.0 \times 10^{-4}$ gibt den doppelten Wert der Durchschnittswahrscheinlichkeit an, oberhalb dessen das Auftreten eines ß-turns sehr wahrscheinlich ist.

α-Helix	Konformationszuordnung	$\langle P_\alpha \rangle$	$\langle P_\beta \rangle$	N-terminale α-Tetrapeptid-Brecher	C-terminale α-Tetrapeptid-Brecher
17-27	$H_3h_3Ii_4$	1.13	1.08	BhIi	HhiB
54-61	H_2h_4Ii	1.18	0.89	ihih	IHBB
64-68	Hh_4	1.20	1.01	BBhH	BHhi
88-94	Hh_5I	1.16	1.01	hHbI	-
ß-Faltblatt				ß-Tetrapeptid-Brecher	
4-19	$H_7h_5i_3b$	1.09	1.29	BbiH	iHib
22-25	H_2hb	0.93	1.31	iHib	HBhB
45-51	H_3h_3b	0.93	1.28	biBH	Bhhi
71-75	Hh_2ib	0.96	1.20	ihbi	ibhb
82-87	H_3h_3	1.06	1.37	bbih	hHBB

Tabelle 9: Konformationszuordnung der mit Hilfe der Chou-Fasman-Regeln (110) vorhersagbaren α-helikalen und ß-Faltblattbereiche des C-terminalen acidolytischen Peptids A2 des ADP/ATP-Carriers.

$\langle P_\alpha \rangle$ und $\langle P_\beta \rangle$ sind die Potentiale der helikalen und Faltblattregionen, die durch Mittelwertbildung der Konformationsparameter P_α und P_β der einzelnen Aminosäuren gewonnen wurden. Die N- und C-terminalen Grenzen wurden zusätzlich mit den "Grenzwerttabellen" überprüft.

A2, das wahrscheinlich durch die Spaltung einer säurelabilen Asp-Pro- oder einer Asn-Pro-Bindung entstanden ist, beginnt mit einem ß-turn. Als Startpunkt des ß-turns wurde Asparginsäure angenommen. Aspargin als Anfangspunkt des ß-turns würde nur zu einer minimalen Veränderung der Gesamtwahrscheinlichkeit P_t führen, da beide Aminosäurereste mit ähnlich großer Häufigkeit in Position 1 von ß-turns vorkommen (Aspargin: 0.161; Asparginsäure: 0.147).

Daran anschließend folgt ein 16 Aminosäuren langes Faltblatt ($Val^{4'}$ ... $Val^{19'}$) mit einem durchschnittlichen ß-Potential $\langle P_\beta \rangle$ = 1.29 und einem wesentlich schwächeren α-Potential $\langle P_\alpha \rangle$ = 1.09. Die Bildung von Faltblattkernen zwischen Isoleucin $^{6'}$ und Valin $^{8'}$ (H_3) oder Tryptophan $^{10'}$ und Isoleucin $^{12'}$ (H_2h) oder Glutamin $^{14'}$ und Threonin $^{17'}$ (Hh_3) und hoher durchschnittlicher Grenzwertpotentiale sowohl der jeweils drei terminalen Aminosäuren des Faltblattes ($\langle P_{\beta N} \rangle$ = 1.39; $\langle P_{\beta C} \rangle$ = 1.24) als auch der drei nicht-terminalen Aminosäuren ($\langle P_{n\beta N} \rangle$ = 1.51; $\langle P_{n\beta C} \rangle$ = 1.0) ermöglichen eine eindeutige Lokalisierung dieses Faltblattes. Theoretisch wäre eine C-terminale Verlängerung bis Tyrosin $^{25'}$ möglich, da der Tetrapeptidbrecher Ala-Val-Ala $^{20'}$-Gly (iHib) mit einem $\langle P_\beta \rangle$ = 1.03 über dem kritischen Wert von 1.0 liegt. Da aber bei der statistischen Auswertung der Längen von α-helikalen und ß-Faltblattstrukturen der untersuchten 29 Proteine Chou und Fasman maximale ß-Faltblattlängen von 17 Aminosäuren beobachteten (110), wurde die Verlängerung des Faltblattes von Threonin $^{17'}$ bis Tyrosin $^{25'}$ unterlassen.

Es folgt ein weiteres kurzes Faltblatt, das mit $\langle P_\beta \rangle$ = 1.31 von Leucin $^{21'}$ bis Tyrosin $^{25'}$ reicht. Das C-terminale Tyrosin $^{25'}$ ist gleichzeitig Anfang eines ß-turns.

Die letzten beiden Aminosäuren dieses ß-turns (Phe $^{27'}$-Asp $^{28'}$) gehören bereits zur unmittelbar daran anschließenden α-Helix, die bis Glutamin $^{37'}$ reicht. Der Helixkern befindet sich im C-terminalen Bereich Met-Met $^{35'}$-Met-Glu (H_3h), der N-terminal

verlängert wird. In dieser Region treten Tetrapeptide der Klassifizierung (hi_3) auf (Thr-Val $^{30'}$-Arg-Arg und Asp-Thr-Val $^{30'}$-Arg), die, obwohl deren $\langle P_\alpha \rangle < 1$, nach den zuvor erwähnten Regeln die Verlängerung ermöglichen. Ein zusätzliches Indiz für die Bevorzugung der α-helikalen Konformation ist, daß die Sequenz Arg-Arg-Arg häufiger in helikaler als in der ß-Faltblatt-Konformation zu finden ist (110).

Zwischen den Positionen 37' und 40' folgt ein weiterer ß-turn. Im Anschluß an einen random-coil-Bereich schließt ein ß-Faltblatt an, das von Isoleucin $^{45'}$ bis Valin $^{51'}$ reicht. Innerhalb dieses Faltblattes tritt in Position eine hohe ß-turn Wahrscheinlichkeit auf (siehe Abb. 17E). Das ß-turn-Potential $\langle P_t \rangle$ in dieser Umgebung liegt aber deutlich niedriger als das sehr starke ß-Potential $\langle P_\beta \rangle$. Als Konsequenz daraus kann dieser Abschnitt als ß-Faltblatt vorhergesagt werden.

Der ß-turn in Position $^{51'}$ verknüpft das vorhergehende Faltblatt mit einer α-Helix, die von Tryptophan $^{54'}$ bis Glutaminsäure $^{61'}$ reicht. Nach einem ß-turn in Position 62 schließt eine nur 5 Aminosäuren lange Helix mit einem hohen α-Potential an $\langle P_\alpha \rangle = 1.20$ an, die sich von Lysin $^{64'}$ bis Lysin $^{68'}$ erstreckt (Hh_4). Diese Zuordnung, obwohl sie nicht den strengen Chou-Fasman-Regeln entspricht, ist dennoch gerechtfertigt, da die Autoren in ihrem "Satz" von 29 untersuchten Proteinen neben vier Helices mit nur vier Aminosäuren auch zehn mit fünf Aminosäureresten beobachtet haben.

Vor dem letzten ß-turn, der bei Glycin $^{77'}$ beginnt, befindet sich noch ein kurzes Faltblatt von Tryptophan $^{71'}$ bis Leucin $^{75'}$ mit $\langle P_\beta \rangle$ von 1.20. Nach diesem ß-turn folgt noch ein ß-Faltblatt, das von Phenylalanin $^{82'}$ bis Tyrosin $^{87'}$, und eine α-Helix, die von Asparginsäure $^{88'}$ bis Valin $^{94'}$ reichen. Der Umfang der beiden letzten Konformationsbereiche konnte eindeutig durch entsprechende Tetrapeptidbrecher und durch Grenzwertanalyse festgelegt werden (Tab. 9).

Der als α-helikal vorhersagbare Anteil von A2 umfaßt mit 31 Aminosäureresten (von 94) 33%, während der als ß-Faltblatt vorhersagbare Teil mit 38 Aminosäureresten 40% von A2 ausmacht.

7 Überprüfung der Chou-Fasman-Regeln zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Membranproteinen am Beispiel des Bakteriorhodopsins

Um die Anwendbarkeit der Chou-Fasman-Regeln zur Vorhersage von Sekundärstrukturen bei membrangebundenen Proteinen zu überprüfen, wurde als Modellbeispiel das Bakteriorhodopsin aus Halobakterium halobium herangezogen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Purpurmembran, mit einer Auflösung von 7 Å, haben ergeben, daß dieses Membranprotein, das der Energieumwandlung von Licht über einen Protonengradienten zu ATP dient, in sieben helikale Abschnitte unterteilt ist, die fast senkrecht zur Membranoberfläche angeordnet sind (95, 96).

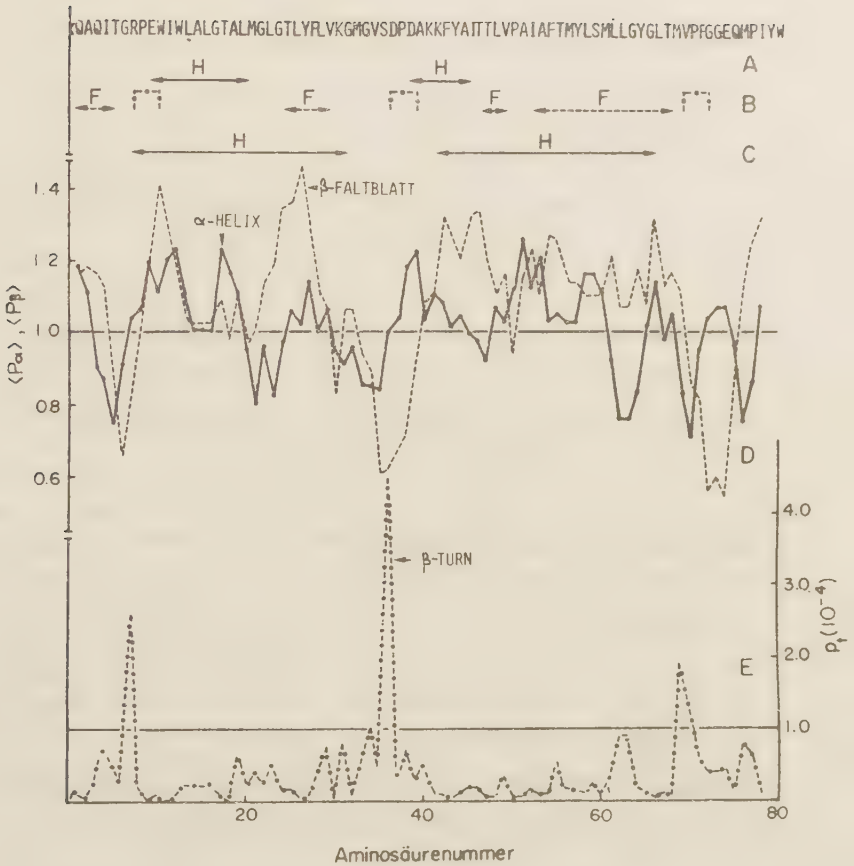


Abb. 18: Vergleich zwischen vorhergesagtem Konformationsprofil und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der ersten beiden N-terminalen Helices von Bakteriorhodopsin.

(A) Primärstruktur der N-terminalen Region von Bakteriorhodopsin in der "Ein-Buchstaben-Schreibweise".

(B) Die mit den Chou-Fasman-Regeln vorhersagbaren α-helikalen (H), ß-Faltblatt (F) und ß-turn-Bereiche.

(Forts. siehe nächste Seite)

Wendet man die Chou-Fasman-Regeln auf die ersten beiden N-terminalen helikalen Bereiche (80) der veröffentlichten Primärstruktur von Bakteriorhodopsin (Abb. 18A) an, kommt man zu folgendem Ergebnis: Die Positionen der Umkehr der einzelnen Helices, die sich außerhalb der Membran befinden (96), konnten exakt vorausgesagt werden (Abb. 18E).

Die Voraussage der in der Purpurmembran eingebetteten helikalen Abschnitte erwies sich als unbefriedigend (Abb. 18B und C). Elektronenmikroskopisch wurde die erste Helix zwischen Arginin ^{7} und Glycin ^{31} beobachtet.

Wendet man die Chou-Fasman-Regeln auf den N-terminalen Bereich von Bakteriorhodopsin an, beginnt die erste Helix bei Glutaminsäure ^{9} (davor der "Tetrapeptidbrecher" Arg-Pro-Glu-Trp ^{10} mit der Klassifizierung (IBHh) (Tab. 10), von dem die letzten beiden Aminosäurereste noch in die Helix eingebaut werden) und endet bereits bei Methionin ^{22} an dem "Tetrapeptidbrecher" Met^{20}-Gly-Leu-Gly (HBHB) mit einem durchschnittlichen α-Potential von $\langle P_\alpha \rangle$ = 0.95. Von Threonin ^{24}

(Forts. der Bildunterschrift zu Abb. 18):
(C) Die Lage der elektronenmikroskopisch beobachteten ersten beiden x-Helices.
(D) Das mittlere helikale ($-\frac{H}{}-$) und ß-Faltblattpotential ($-\frac{F}{}-$) von Tetrapeptiden, die sich von Position (i) bis (i+3) erstrecken.
(E) Das ß-turn Wahrscheinlichkeitsprofil P_t (-.-) von Tetrapeptiden, das durch Produktbildung der Häufigkeiten der 4 Aminosäuren in Position (i) bis (i+3) ermittelt wurde.

bis Valin [29] überwiegt ein sehr starkes ß-Potential von $\langle P_\beta \rangle$ = 1.61 über das schwache α-Potential von $\langle P_\alpha \rangle$ = 1.02 (Abb. 18D) und erlaubt somit keine Vorhersage dieses Abschnitts als α-helikal. Noch weniger zuverlässig wird die Vorhersagemethode nach dem zweiten ß-turn. Die längste konstruierbare Helix beginnt bei Asparginsäure [38] und wird von dem "helixbrechenden Tetrapeptid" Thr-Leu-Val-Pro[50] (iHhb) begrenzt. Da das ß-Potential in diesem Bereich mit $\langle P_\beta \rangle$ = 1.13 größer ist als das α-Potential mit $\langle P_\alpha \rangle$ = 1.08, läßt sich nur eine kurze Helix von Asparginsäure [38] bis Alanin [44] voraussagen. Entgegen den elektronenmikroskopischen Befunden, die auf eine helikale Konformation hinweisen, folgen noch bis zum nächsten ß-turn in Position 69 ein kürzeres Faltblatt von Isoleucin [45] bis Valin [49] und von Isoleucin [52] bis Methionin [68]. Allerdings besitzt das längere Faltblatt neben dem ß-Potential von $\langle P_\beta \rangle$ = 1.26 auch ein beträchtliches α-Potential von 1.11.

α-Helix	Konformationszuordnung	P_α	P_β	N-terminale α-Tetrapeptid-Brecher	C-terminale
9-20	H_7h_3iB	1.18	1.11	BIBH	HBHB
38-44	H_2h_3Ib	1.14	0.93	iIBI	Hhii
ß-Faltblatt					
1- 5	Hh_3i	1.11	1.16	-	hbiB
24-29	H_2h_4	1.02	1.41	bhbh	bbhb
45-49	H_2h_3	1.00	1.40	$\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$	BiHi
52-69	$H_4h_{10}ib_3$	1.11	1.26	BiHi	Bhbb

Tabelle 10: Konformationszuordnung der vorhersagbaren α-helikalen und ß-Faltblattbereiche von Bakteriorhodopsin entsprechend der α- und ß-Zuordnung der einzelnen Aminosäuren.
$\langle P_\alpha \rangle$ und $\langle P_\beta \rangle$ sind die Potentiale der jeweiligen helikalen und Faltblattbereiche, deren N- und C-terminale Enden zusätzlich mit Hilfe der Grenzwertanalyse untersucht wurden.

Eine Möglichkeit, daß es bei der Anwendung der Chou-Fasman-Regeln auf membrangebundene Proteine zu Unstimmigkeiten mit experimentellen Befunden kommt, ist, daß Sequenzabschnitte, die sowohl α - als auch ß-Potential haben, lösungsmittelabhängige Umklappvorgänge von ß- und α-Konformation erfahren (111-112). Auf Membranproteine angewandt würde das bedeuten, daß durch die Wechselwirkung zwischen Proteinen und den Phospholipiden Konformationsänderungen möglich sein sollten.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung und Charakterisierung der Bromcyanpeptide des Adeninnucleotid-Translokators aus Rinderherzmitochondrien beschrieben. Da sich sowohl das gesamte Protein als auch das große Bromcyanpeptid B1, das etwa 2/3 der Polypeptidkette ausmacht, als N-terminal blockiert erwiesen, wurden die hier beschriebenen Untersuchungen auf das C-terminale Drittel der Primärstruktur beschränkt.

Durch limitierte saure Hydrolyse des gesamten Proteins in 80% Ameisensäure konnte ein Fragment erhalten werden (A2), das ebenfalls das C-terminale Drittel des Carrier-Proteins umfaßt. Die Sequenzanalyse dieses durch saure Hydrolyse gewonnenen Peptids über 34 Abbauschritte hinweg ermöglichte die Überlappung zweier kleinerer Bromcyanpeptide.

Die endgültige Festlegung der Reihenfolge der kleineren Bromcyanpeptide erfolgte durch die Isolierung und Sequenzierung tryptischer Peptide des durch saure Hydrolyse des Carrier-Proteins isolierten Bruchstückes A2. Vor der Inkubation mit Trypsin wurden die Lysinreste von A2 mit Citraconsäureanhydrid blockiert, um ein überschaubares Spaltmuster zu erhalten.

Mit der Sequenz dieses Peptids A2 liegt etwa ein Drittel der Primärstruktur des Adeninnucleotid-Translokators vor. Vergleicht man diese Sequenz mit den wenigen bisher bekannten Strukturen weiterer integraler Membranproteine, lassen sich nur kurze Abschnitte einfacher Homologien feststellen.

Die Vorhersage der Sekundärstruktur des C-terminalen Bereichs des Carrier-Proteins ist spekulativ, weil diese Vorhersagen auf der statistischen Auswertung globulärer Proteine beruhen. Die Anwendung dieser Methode auf Membranproteine kann, wie am Beispiel des Bakteriorhodopsins gezeigt wurde, zu falschen Schlüssen führen.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat
Dansyl-	1,5-Dimethylaminonaphthalinsulfonyl-
CAT	Carboxyatractylosid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
H-Ser	Homoserin
o-JBA	o-Iodosobenzoesäure
Gua-HCl	Guanidinhydrochlorid
TPCK	L-(1-Tosylamido-2-phenyl)ethyl-chlormethyl-keton
DITC	p-Phenylendiisothiocyanat
Pyr	Pyroglutaminsäure

8. Literatur

(1) Pfaff, E., Klingenberg, M., Ritt, E. und Vogell, W. (1968), Eur. J. Biochem. 5, 222-232.

(2) Heldt, H.W. (1972), Angew. Chem. 84, 792-798.

(3) Singer, S.J. und Nicolson, G.L. (1972), Science 175, 720-731.

(4) Dickersen, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, B., Samson, L., Cooper, A. und Margoliash, E. (1971), J. Biol. Chem. 246, 1511-1535.

(5) La Noue, K.F. und Schoolworth, A.C. (1979), Annu.Rev. Biochem. 48, 871-922.

(6) Klingenberg, M. und Pfaff, E. (1966), in: "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria", Hrsg.: Tager, J.M. et al., Elsevier, Amsterdam, 180-201.

(7) Klingenberg, M. (1975), in: "The Enzymes of Biological Membranes: Membrane Transport", Vol. 3, Hrsg.: Martonosi, A.N., Plenum Publ. Corp., New York/London, 383-438.

(8) Vignais, P.V. (1976), Biochim. Biophys. Acta 456, 1-38.

(9) Weidemann, M.J., Erdelt, H. und Klingenberg, M. (1970), Eur. J. Biochem. 16, 313-335.

(10) Klingenberg, M., Buchholz, M., Erdelt, H., Falkner, G., Grebe, K., Kadner, H., Scherer, B., Stengel-Rutkowski, L. und Weidemann, M.J. (1971), in: "Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes", Hrsg.: Azzone, G.F. et al., Academic Press, New York/London, 465-486.

(11) Klingenberg, M., Grebe, K. und Scherer, B. (1975), Eur. J. Biochem. 52, 351-363.

(12) Vignais, P.V., Vignais, P.M., Lauquin, G. und Morel, F. (1973), Biochemie 55, 763-778.

(13) Klingenberg, M. und Buchholz, M. (1973), Eur. J. Biochem. 38, 346-358.

(14) Pfaff, E. und Klingenberg, M. (1968), Eur. J. Biochem. 6, 66-79.

(15) Piozzi, F., Quilico, A., Mondelli, R., Ajello, T., Spiro, V. und Melera, A. (1966), Tetrahedron 8, 515-528.

(16) Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B. (1971), Fitoterapia 42, 91-93.

(17) Lijmbach, G.W.M., Cox, H.C., Berends, W., Bruijn, J., Frost, D.J., Nugteren, D.H. und Gaudemer, A. (1973), Tetrahedron 29, 1541-1547.

(18) Vignais, P.V., Vignais, P.M. und Defaye, G. (1973), Biochemistry 12, 1508-1518.

(19) Brandolin, G., Meyer, C., Defaye, G., Vignais, P.M. und Vignais, P.V. (1974), FEBS-Lett. 46, 149-153.

(20) Babel, W. (1975), Diplomarbeit, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Universität München.

(21) Babel, W., Aquila, H., Beyer, K. und Klingenberg, M. (1976), FEBS-Lett. 61, 124-127.

(22) Lauquin, G.J.M. und Vignais, P.V. (1976), Biochemistry 15, 2316-2322.

(23) Lauquin, G.J.M., Duplaa, A.M., Klein. G., Rousseau, A. und Vignais, P.V. (1976), Biochemistry 15, 2323-2327.

(24) Klingenberg, M. (1974), in: "Dynamics of Energy-Transducing Membrenes", Hrsg.: Ernster, E. et al., Elsevier, Amsterdam, 511-528.

(25) Klingenberg, M. (1980), J. Membrane Biol. 56, 97-105.

(26) Klingenberg, M. (1979), Trends in Biochem. Sci. Nov, 1-4.

(27) Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1975), FEBS-Lett. 56, 129-132.

(28) Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1975), FEBS-Lett. 56, 133-138.

(29) Aquila, H., Eiermann, W., Babel, W. und Klingenberg, M. (1978), Eur. J. Biochem, 85, 549-560.

(30) Neville, D.M. (1971), J. Biol. Chem. 246, 6328-6334.

(31) Hackenberg, H. und Klingenberg, M. (1980), Biochemistry 19, 548-555.

(32) Hackenberg, H. (1979), Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Universität München.

(33) Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977), FEBS-Lett. 82, 363-367.

(34) Krämer, R. und Klingenberg, M. (1979), Biochemistry 18, 4209-4215.

(35) Krämer, R. und Klingenberg, M. (1980), Biochemistry 19, 556-560.

(36) Jackl, H. und Sebald, W. (1975), Eur. J. Biochem. 54, 97-106.

(37) Sebald, W., Machleidt, W. und Otto, J. (1973), Eur. J. Biochem. 38, 311-324.

(38) Weiß, H. und Ziganke, B. (1974), Eur. J. Biochem. 41, 63-71.

(39) Hackenberg, H., Riccio, P. und Klingenberg, M. (1978), Eur. J. Biochem. 88, 373-378.

(40) Hallermayer, G., Zimmermann, R. und Neupert, W. (1977), Eur. J. Biochem. 81, 523-532.

(41) Harmey, M.A., Hallermann, G., Korb, H. und Neupert, W. (1977), Eur. J. Biochem. 81, 533-544.

(42) Zimmermann, R., Paluch, U., Sprinzl, M. und Neupert, W. (1979), Eur. J. Biochem. 99, 247-252.

(43) Nelson, N. und Schatz, G. (1979), in: Membrane Bioenergetics, Hrsg.: Lee, C.-P., Schatz, G. und Ernster, L., Addison-Wesley, Reading, 133-152.

(44) Neupert, W. und Schatz, G. (1981), Trends in Biochem. Sci. Jan, 1-4.

(45) Bernardi, G. (1971), Methods Enzymol, 22, 325-339.

(46) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, A.J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265-275.

(47) Helenius, A. und Simons, K. (1972), J. Biol. Chem. 247, 3656-3661.

(48) Bode, C., Goebell, H. und Stähler, E. (1968), Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 418-422.

(49) Swank, R.T. und Munkres, K.D. (1971), Anal. Biochem. 39, 462-477.

(50) Georgopulos, D. und Wieland, H. (1964), Biochem. Z. 340, 476-482.

(51) Felix, A. und Jimenez, M.H. (1974), J. Chromatog. 89, 361-364.

(52) Vandekerckhove, J. und van Montagu, M. (1974), Eur. J. Biochem. 44, 279-288.

(53) Reindel, F. und Hoppe, W. (1954), Chem. Ber. 87, 1103-1107.

(54) Gray, W.R. (1967), Methods Enzymol. 11, 139-151.

(55) Liu, T.Y. und Chang, Y.H. (1971), J. Biol. Chem. 246, 2842-2848.

(56) Machleidt, W. und Wachter, E. (1977), Methods Enzymol. 47, 263-277.

(57) Löw, H. und Vallin, I. (1963), Biochim. Biophys. Acta 60, 361-374.

(58) Klingenberg, M., Aquila, H. und Riccio, P. (1979), Methods Enzymol. 46, 407-414.

(59) Crestfield, A.M., Moore, S. und Stein, W.H. (1963), J. Biol. Chem. 238, 622-627.

(60) Gross, E. (1967), Methods Enzymol. 11, 238-255.

(61) Landon, M. (1977), Methods Enzymol. 47, 145-148.

(62) Mahoney, W.C. und Hermodson, M.A. (1979), Biochemistry 18, 3810-3814.

(63) Wachter, E. und Werhahn, R. (1979), Anal. Biochem. 97, 56-64.

(64) Dixon, H.B.F. und Perham, R.N. (1968), Biochem. J. 109, 312-314.

(65) Ambler, R.P. (1967), Methods Enzymol. 25, 262-272.

(66) Podell, D.N. und Abraham, G.N. (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 176-185.

(67) Machleidt, W., Assfalg, I., Rückl, G. und Wachter, E. (1975), in: "Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis", Hrsg.: Laursen, R.A., Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, 17-30.

(68) Wachter, E. und Werhahn, R. (1980), in: "Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis", Hrsg.: Birr, C., Elsevier/North Holland, 21-33.

(69) Gerber, G.E., Anderegg, R.J., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Biemann, K. und Khorana, H.G. (1979), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76, 227-231.

(70) Van Beynum, G.M.A., De Graaf, J.M., Castel, A. und Bosch, L. (1977), Eur. J. Biochem. 72, 63-78.

(71) Sheehan, J.G. und Chang, D.H. (1958), J. Am. Chem. Soc. 80, 1154-1158.

(72) Hofmann, K. und Yajima, H. (1961), J. Am. Chem. Soc. 83, 2289-2293.

(73) Stegink, L.D., Sandborn, B.M., Brummel, M.C. und Vestling, C.S. (1971), Biochim. Biophys. Acta 251, 31-37.

(74) Houmard, J. und Drapeau, G.R. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3506-3509.

(75) Drapeau, G.R. (1977), Methods Enzymol. 47, 189-191.

(76) Bornstein, G. (1970), Biochemistry 9, 2408-2421.

(77) Bornstein, P. und Balian, G. (1977), Methods Enzymol. 47, 132-145.

(78) Ozols, J. und Gerard, C. (1977), J. Biol. Chem. 252, 5986-5989.

(79) Savige, W.E. und Fontana, A. (1977), Methods Enzymol. 47, 459-469.

(80) Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V. und Lobanov, N.A. (1979), FEBS-Lett. 100, 219-224.

(81) Sebald, W., Hoppe. J. und Wachter, E. (1979), in: "Function and Molecular Aspects of Membrane Transport", Hrsg.: Quagliariello, E. et al., Elsevier/ North Holland, 63-74.

(82) Sebald, W., Machleidt, W. und Wachter, E. (1980), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 785-789.

(83) Tomita, M. und Marchesi, V.T. (1975), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2964-2968.

(84) Asbeck, F., Beyreuther, K., Köhler, H., Wettstein, G. und Braunitzer, G. (1969), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1047-1066.

(85) Ozols, J. und Gerard, C. (1977), Proc.Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3725-3729.

(86) Steffens, G.J. und Buse, G. (1979), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 613-619.

(87) Chen, R., Hindenach, I. und Henning, V. (1978), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1807-1810.

(88) Chen, R., Schmidmayr, W., Krämer, C., Chen-Schmeisser, U. und Henning, V. (1980), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4592-4596.

(89) Allen, G. und Green, N.M. (1976), FEBS-Lett. 63, 188-192.

(90) Allen, G. und Green, N.M. (1978), Biochem. J. 173, 393-402.

(91) Allen. G. (1980), Biochem. J. 187, 545-563.

(92) Allen. G. (1980), Biochem, J. 187, 565-575.

(93) Allen, G., Bottomley, R.C. und Trinnaman, B.J. (1980), Biochem. J. 187, 577-589.

(94) Allen, G., Trinnaman, B.J. und Green, N.M. (1980), Biochem. J. 187, 591-616.

(95) Henderson, R. und Unwin, P.N.T. (1975), Nature 257, 28-32.

(96) Engelmann, D.M., Henderson, R., McLachlan, A.D. und Wallace, B.A. (1980), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2023-2027.

(97) Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V. und Lobanov, N.A. (1977), FEBS-Lett. 84, 1-4.

(98) Abdulaev, N.G., Feigina, M.Y., Kiselev, A.V., Ovchinnikov, Y.A., Drachev, L.A., Kaulen, A.D., Khitrina, L.V. und Skulachev, V.P. (1978), FEBS-Lett. 90, 190-194.

(99) Ehring, R., Beyreuther, K., Wright, J.K. und Overath, P. (1980), Nature 283, 537-540.

(100) Büchel, D.E., Gronenborn, B. und Müller-Hill, B. (1980), Nature 283, 541-545.

(101) Jones, T.H. und Kennedy, E.P. (1969), J. Biol. Chem. 244, 5981-5987.

(102) Teather, R.M., Müller-Hill, B., Abrutsch, V., Aichele, G. und Overath, P. (1978), Molec. gen. Genet. 159, 239-248.

(103) Machleidt, W. und Machleidt, I., persönliche Mitteilung.

(104) Barrel, B.G., unveröffentlicht.

(105) Jagow, G.v., Schägger, H., Engel, W.D., Machleidt, W. und Machleidt, I. (1978), FEBS-Lett. 91, 121-125.

(106) Capaldi, R.A. und Vanderkooi, G. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 930-932.

(107) Boulay, F., Lauquin, G.J.M. und Vignais, P.V. (1979), FEBS-Lett. 108, 390-394.

(108) Lauquin, G., Brandolin, G. Lunardi, J. und Vignais, P.V. (1978), Biochim. Biophys. Acta 501, 10-39.

(109) Lauquin, G., Brandolin, G. und Vignais, P.V. (1976), FEBS-Lett. 67, 306-311.

(110) Chou, P.Y. und Fasman, G.D. (1978), Advances Enzymol. 47, 45-148.

(111) Hardman, K.D. und Ainsworth, C.F. (1972), Biochemistry 11, 4910-4919.

(112) McCubbin, W.D., Oikawa, K. und Kay, C.M. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 666-674.

Lebenslauf

Wilfried Babel

geboren am 15.11.1948 in Kempten (Allgäu) als ältestes Kind des Bundesbahnbeamten Rudolf Babel + und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb. Kleinwächter +

9/1955 - 7/1959	Volksschule Wildpoldsried (Allgäu)
9/1959 - 7/1968	Allgäu-Gymnasium Kempten
11/1968 - 7/1971	Studium der Chemie an der Universität Stuttgart (Diplom-Vorprüfung)
11.6.1971	Eheschließung mit der Dipl.-Soziologin Ingrid Eilers
9/1971 - 7/1980	Fortsetzung des Studiums der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Diplomarbeit und Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München, Lehrstuhl Prof. Dr. M. Klingenberg.
seit 8/1980	Wissenschaftlicher Assistent am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Abt. Prof. Dr. K. Kühn

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545 /8791